

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

06.08.2004

REC'D 02 SEP 2004

WIPO

PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 10 2004 028 859.3

**Anmeldetag:** 15. Juni 2004

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

**Priorität:** 01. August 2003 DE 103 35 253.8  
11. Mai 2004 DE 10 2004 023 055.2

**IPC:** C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 29. Juli 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
 Im Auftrag

Stremme

**Verfahren zur Herstellung von L-Threonin**

Gegenstand der Erfindung ist ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae.

**5 Stand der Technik**

L-Threonin findet in der Tierernährung, in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Threonin durch Fermentation von Stämmen der Familie der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli hergestellt werden kann. Wegen der großen Bedeutung dieser Aminosäure wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet.

Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie z.B. die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen, d.h. die genetisch bedingten Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Es ist bekannt, dass Threonin durch Fermentation von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli, im Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) hergestellt werden kann. Im Satzverfahren werden alle Nährstoffe direkt zu Beginn der Fermentation vorgelegt. Im Zulaufverfahren wird ein Zusatz-Nährmedium der Kultur zugeführt. Dieser Zulauf kann direkt zu Beginn der Kultivierung oder nach Ablauf einer bestimmten Kultivierungszeit starten, beispielsweise dann, wenn eine mit dem vorgelegten ersten Nährmedium eingebrachte Komponente verbraucht worden ist. Bei Fermentationsende wird der komplette Inhalt des Fermenters geerntet und das in der Fermentationsbrühe enthaltene

Threonin isoliert und gereinigt oder anderweitig verarbeitet. Dieser Prozess ist beispielsweise in den Patentschriften US 5,538,873, EP-B-0593792, WO 01/4525 und bei Okamoto et al. (Bioscience, Biotechnology, and 5 Biochemistry 61 (11), 1877 - 1882, 1997) beschrieben.

Ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Threonin unter Verwendung von Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli, ist in der Patentschrift US 6,562,601 beschrieben. Es besteht darin, dass das Bakterium 10 zunächst nach dem Zulaufverfahren kultiviert wird, wobei sich Threonin in der Fermentationsbrühe anreichert. Zu einem gewünschten Zeitpunkt wird ein Teil, d.h. 10 bis 99% der im Fermenter enthaltenen Fermentationsbrühe geerntet. Der restliche Teil der Fermentationsbrühe verbleibt im 15 Fermenter. Die im Fermentierbehälter verbleibende Fermentationsbrühe wird mit Nährmedium aufgefüllt und eine weitere Fermentation nach dem Zulaufverfahren durchgeführt. Der beschriebene Zyklus wird gegebenenfalls mehrfach durchgeführt.

## 20 Aufgabe der Erfindung

Es war Aufgabe dieser Erfindung, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Threonin bereitzustellen.

## Beschreibung der Erfindung

25 Gegenstand der Erfindung ist ein Fermentationsverfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass man

a) ein L-Threonin produzierendes Bakterium der Familie Enterobacteriaceae in mindestens einem ersten Nährmedium inkuliert und kultiviert,

30 b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur

kontinuierlich zuführt, wobei das weitere  
Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens  
eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine  
Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle  
5 enthalten, unter Bedingungen, die die Bildung von  
L-Threonin erlauben, und gleichzeitig der Kultur  
Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren  
Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im  
wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe  
10 der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen,  
wobei

- c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle(n) während  
der kontinuierlichen Kultivierung bei maximal 30  
g/l eingestellt wird.
- 15 Erfnungsgemäß kann die Anlagenleistung eines L-Threonin  
produzierenden Fermenters dadurch gesteigert werden, dass  
man in dem oben beschriebenen ersten Schritt a) nach dem  
Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch)  
kultiviert, wobei bei Verwendung des Zulaufverfahrens  
20 mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird. In dem  
beschriebenen anschließenden Schritt b) werden mindestens  
ein weiteres Nährmedium oder mehrere weitere Nährmedien in  
einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur  
kontinuierlich zugeführt und gleichzeitig wird der Kultur  
Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren  
25 Entnahmeströmen entnommen, der oder die im wesentlichen dem  
zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme  
entspricht/entsprechen.

Unter dem Begriff Anlagenleistung versteht man, dass in  
30 einer Anlage (plant) wie z. B. einem Fermenter die Masse  
bzw. Menge eines Produktes z. B. L-Threonin mit einer  
bestimmten Ausbeute und mit einer bestimmten  
Geschwindigkeit bzw. Produktivität oder Raum-Zeit-Ausbeute  
hergestellt wird. Diese Parameter bestimmen weitgehend die  
35 Kosten bzw. die Wirtschaftlichkeit eines Verfahrens.

Unter einer Kulturbrühe versteht man die durch die Kultivierung eines Mikroorganismus - im Falle der vorliegenden Erfindung ein L-Threonin produzierendes Bakterium - in einem Nährmedium unter Verwendung eines

- 5 Fermenters oder Kulturgefäßes entstandene Suspension eines Mikroorganismus.

Während des Schrittes a) wird das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inkuliert und nach dem Satzverfahren (batch) oder Zulaufverfahren (fed batch) 10 kultiviert. Bei Verwendung des Zulaufverfahrens wird nach mehr als 0 bis maximal 10 Stunden, vorzugsweise nach 1 bis 10 Stunden, bevorzugt nach 2 bis 10 Stunden und besonders bevorzugt nach 3 bis 7 Stunden ein Zusatz-Nährmedium zugeführt.

- 15 Das erste Nährmedium enthält als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerröhr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, 20 Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 1 bis 100 g/kg oder 1 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 45 g/kg, besonders bevorzugt von 20 bis 40 g/kg. Unter Stärkehydrolysat versteht man erfindungsgemäß das Hydrolysat von Stärke aus Mais, Getreide, Kartoffeln oder 25 Tapioka.

- Als Stickstoffquelle im ersten Nährmedium können organische, Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen 30 wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat Kaliumnitrat, Kaliumnatriumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 1 bis 40 g/kg, bevorzugt von 10 bis 30 35 g/kg, besonders bevorzugt von 10 bis 25 g/kg, ganz

besonders bevorzugt 1 bis 30 g/kg oder 1 bis 25 g/kg verwendet werden.

Als Phosphorquelle im ersten Nährmedium können Phosphorsäure, Alkali- oder Erdalkalisalze der

- 5 Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natriumhaltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits, auch Phytinsäure genannt oder deren Alkali- oder Erdalkalisalze, in den  
10 Konzentrationen von 0,1 bis 5 g/kg, bevorzugt von 0,3 bis 3 g/kg, besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,5 g/kg verwendet werden. Das erste Nährmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Diese  
15 Substanzen liegen in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg vor. Schließlich werden essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie  
20 z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

Das Zusatz-Nährmedium, welches in einem Zulaufverfahren (fed batch) angewandt wird, enthält im Allgemeinen lediglich als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Laktose, Galaktose, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 300 bis 700 g/kg, bevorzugt von 400 bis 650 g/kg, und gegebenenfalls eine  
25 anorganische Stickstoffquelle wie z.B. Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat, Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Alternativ können diese und andere Komponenten auch separat zugefüttert werden.

Es wurde gefunden, dass bei der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b) die Bestandteile des weiteren Nährmediums in Form eines einzigen weiteren Nährmediums sowie in einer Vielzahl von weiteren Nährmedien der Kultur zugeführt werden können. Erfindungsgemäß wird das weitere Nährmedium beziehungsweise werden die weiteren Nährmedien in mindestens einem (1) Zufütterungsstrom oder in einer Vielzahl an Zufütterungsströmen mindestens 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 7 oder 2 bis 5 Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt.

Der Begriff „kontinuierlich“ bedeutet, dass der Zufütterungsstrom bzw. die Zufütterungsströme im wesentlichen ununterbrochen, das heißt mit höchstens kurzen, einzelnen Pausen der Kultur hinzugefügt wird/werden. Die einzelnen Unterbrechungen oder Pausen betragen bis zu maximal 0,5, 1, 2 oder 3 Stunden. Die Summe der einzelnen Unterbrechungen bzw. Pausen bei der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b) beträgt maximal 10%, 8%, 6%, 4%, 2% oder 1% der Gesamtzeit der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b).

Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien enthält/enthalten als Kohlenstoffquelle eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr; Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Maltose, Xylose, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Essigsäure, Ethanol und Methanol in den Konzentrationen von 20 bis 700 g/kg, bevorzugt von 50 bis 650 g/kg.

Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Stickstoffquelle bestehend aus organischen, Stickstoff-haltigen Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniak, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat und/oder

Kaliumnitrat oder Kaliumnatriumnitrat. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 5 bis 50 g/kg, bevorzugt von 10 bis 40 g/kg, verwendet werden.

- 5 Weiterhin enthält das weitere Nährmedium bzw. enthalten die weiteren Nährmedien eine Phosphorquelle bestehend aus Phosphorsäure oder den Alkali- oder Erdalkalisalze der Phosphorsäure, insbesondere Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natriumhaltigen Salze, Polymere der Phosphorsäure oder das Hexaphosphorsäureester des Inosits, auch Phytinsäure genannt bzw. die entsprechenden Alkali- oder Erdalkalisalze. Die Phosphorquellen können einzeln oder als Mischung in den Konzentrationen von 0,3 bis 3 g/kg, bevorzugt von 0,5 bis 2 g/kg verwendet werden. Das weitere Nährmedium bzw. die weiteren Nährmedien muss/müssen weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind, in den Konzentrationen von 0,003 bis 3 g/kg, bevorzugt in den Konzentrationen von 0,008 bis 2 g/kg. Schließlich werden essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren (z.B. Homoserin) und Vitamine (z.B. Thiamin) zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden.

Bei Verwendung eines einzigen weiteren Nährmediums wird dieses typischerweise in einem Zufütterungsstrom der Kultur zugeführt. Bei Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien werden diese in einer entsprechenden Vielzahl an Zufütterungsströmen zugeführt. Bei der Verwendung einer Vielzahl weiterer Nährmedien ist zu beachten, dass diese jeweils nur eine der beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen enthalten können, aber auch eine Mischung von den beschriebenen Kohlenstoff-, Stickstoff-, oder Phosphorquellen.

Erfindungsgemäß wird das zugeführte weitere Nährmedium oder die zugeführten weiteren Nährmedien so eingestellt, das ein Phosphor zu Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4; von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; 5 von maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal 0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42; maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal 0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 mmol Phosphor / mol Kohlenstoff besteht.

Der Zufütterungsstrom oder die Summe der Zufütterungsströme

10 in dem erfundungsgemäßen Verfahren werden mit einer Geschwindigkeit entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner als 30 Stunden, bevorzugt kleiner als 25, ganz besonders bevorzugt kleiner als 20 Stunden hinzugeführt. Dabei ist die mittlere Verweilzeit (residence time) die 15 theoretische Zeit, die Teilchen in einer kontinuierlich betriebenen Kultur verbleiben. Die mittlere Verweilzeit wird beschrieben durch das Verhältnis des Flüssigkeitsvolumens des Reaktors und der Durchflussmenge (Biotechnologie, H. Weide, J. Páca und W. A. Knorre, Gustav 20 Fischer Verlag Jena, 1991).

Starkes Wachstum zu Beginn der Kultivierung gemäß Schritt (a) ist normalerweise eine logarithmische Wachstumsphase.

Der logarithmischen Wachstumsphase folgt im Allgemeinen eine Phase von geringerem Zellwachstum als in der logarithmischen Phase.

Beginnt das erfundungsgemäße Verfahren in Schritt a) mit einem Satzverfahren so wird/werden nach > (größer) 0 bis 20 Stunden, 1 bis 20 Stunden, nach 1 bis 10 Stunden, 2 bis 10 Stunden oder 3 bis 7 Stunden bezogen auf den Beginn des

30 Satzverfahrens ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt. Der Beginn der Entnahme der Kulturbrühe mit einem oder mehreren Entnahmeströmen erfolgt mit dem Beginn der Zuführung des weiteren Nährmediums bzw. der 35 weiteren Nährmedien oder zeitlich versetzt, d.h. vor oder

nach Beginn der Zuführung des weiteren Nährmediums oder der weiteren Nährmedien. Falls der Beginn der Zufütterung und der Beginn der Entnahme zeitlich versetzt erfolgen, beträgt die entsprechende Zeitdifferenz im Allgemeinen maximal 5

5 Stunden, 3 Stunden, 2 Stunden oder 1 Stunde.

Beginnt das erfindungsgemäße Verfahren in Schritt a) mit einem Zulaufverfahren so wird/werden nach > (größer) 0 bis 80 Stunden, 1 bis 80 Stunden, nach 1 bis 60 Stunden, 5 bis 50 Stunden, 6 bis 45 Stunden, oder 8 bis 40 Stunden bezogen

10 auf den Beginn des Zulaufverfahren ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren

Zufütterungsströmen der Kultur zugeführt. Der Beginn der Entnahme der Kulturbrühe mit einem oder mehreren Entnahmeströmen erfolgt mit dem Beginn der Zuführung des

15 weiteren Nährmediums bzw. der weiteren Nährmedien oder zeitlich versetzt, d.h. vor oder nach Beginn der Zuführung des weiteren Nährmediums. Falls der Beginn der Zufütterung und der Beginn der Entnahme zeitlich versetzt erfolgen, beträgt die entsprechende Zeitdifferenz im Allgemeinen

20 maximal 5 Stunden, maximal 3 Stunden, maximal 2 Stunden oder maximal 1 Stunde.

Nach > (größer) 0 bis 100 Stunden, 1 bis 85 Stunden, 2 bis 80 Stunden, 3 bis 75 Stunden, 5 bis 72 Stunden, 10 bis 72 Stunden, 10 bis 60 Stunden, oder 15 bis 48 Stunden bezogen

25 auf den Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens gemäß Schritt (a) entspricht der Entnahmestrom oder die Summe der Entnahmeströme im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme und der Zustand der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt b) des

30 erfindungsgemäßen Verfahrens ist erreicht. Im wesentlichen bedeutet hier, dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% oder 95% - 105% des Zufütterungsstroms oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht. Die Entnahme kann durch

Abpumpen und oder durch Ablassen der Kulturbrühe technisch realisiert werden.

Erfindungsgemäß wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle mindestens während der kontinuierlichen Kultivierung gemäß Schritt (b) im Allgemeinen bei maximal 30 g/l, maximal 20 g/l, maximal 10 g/l, bevorzugt bei maximal 5 g/l, besonders bevorzugt maximal 2 g/l eingestellt. Diese Konzentration wird mindestens während 75%, bevorzugt mindestens während 85%, besonders bevorzugt mindestens während 95% der Zeit der Kultivierung gemäß Schritt (b) aufrechterhalten. Dabei wird die Konzentration der Kohlenstoffquelle anhand von Methoden bestimmt, die Stand der Technik sind.  $\beta$ -D-Glukose wird z.B. in einem Glukoseanalysator YSI 02700 Select der Firma Yellow Springs Instruments (Yellow Springs, Ohio, USA) bestimmt.

Gegebenenfalls kann die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder einem sauerstoffhaltigen Gas versehen werden bis die Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l, unter 1 g/l oder unter 0,5 g/l sinkt.

In einem erfundungsgemäßen Verfahren beträgt die Ausbeute mindestens 31 %, mindestens 33 %, mindestens 35 %, mindestens 37 %, mindestens 38 %, mindestens 40 %, mindestens 42 %, mindestens 44 %, mindestens 46 % oder mindestens 48 %. Dabei ist die Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Menge an L-Threonin zu der Gesamtmenge der eingesetzten oder verbrauchten Kohlenstoffquelle.

In einem erfundungsgemäßen Verfahren wird L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std., von mindestens 2,5 bis 3,5 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std., von mindestens 3,5 bis mehr als 5,0 g/l pro Std., oder von mindestens 5,0 bis 8,0 g/l oder mehr pro Std. gebildet. Dabei ist die Raum-Zeit-

Ausbeute definiert als das Verhältnis von der in einer Kultivierung gesamt gebildeten Threoninmenge zu dem Volumen der Kultur über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gesehen. Die Raum-Zeit-Ausbeute wird auch volumetrische

5 Produktivität genannt.

Naturgemäß wird bei einem Fermentationsverfahren wie dem erfindungsgemäßen das Produkt mit einer bestimmten Ausbeute und mit einer bestimmten Raum-Zeit-Ausbeute (volumetrische Produktivität) hergestellt. In einem erfindungsgemäßen 10 Verfahren kann L-Threonin mit einer Ausbeute von mindestens 31 Gew.-% und einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std. hergestellt werden. Weitere Kopplungen von Ausbeute mit Raum-Zeit-Ausbeute wie beispielsweise eine 15 Ausbeute von mindestens 37 % und eine Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 g/l pro. Std. ergeben sich zwanglos aus den obigen Ausführungen.

Während der Kultivierung wird die Temperatur in einem Bereich von 29 bis 42°C, vorzugsweise von 33 bis 40°C, eingestellt. Die Kultivierung kann bei Normaldruck oder 20 gegebenenfalls bei Überdruck, vorzugsweise bei 0 bis 1,5 bar Überdruck durchgeführt werden. Der Sauerstoffpartialdruck wird auf 5 bis 50%, vorzugsweise ca. 25 20%, Luftsättigung geregelt. Dabei wird die Kultur gerührt und mit Sauerstoff versorgt. Die Regelung des pH-Wertes auf pH ca. 6 bis 8, vorzugsweise 6,5 bis 7,5 kann mit 25%igem Ammoniakwasser erfolgen.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird mindestens ca. 72 Stunden vorzugsweise 100 bis ≥ 300, besonders bevorzugt 200 bis ≥ 300 Stunden betrieben. Im erfindungsgemäßen Verfahren 30 wird das Volumen der Kultur mindestens ein halbes Mal, mindestens 1 Mal, mindestens 2 Mal, mindestens 3 Mal, mindestens 4 Mal, mindestens 6 Mal, mindestens 8 Mal, mindestens 10 Mal, mindestens 12 Mal ausgetauscht.

Aus der entnommenen Kulturbrühe kann das L-Threonin gewonnen, gesammelt oder konzentriert und gegebenenfalls gereinigt werden.

Es ist ebenfalls möglich aus der entnommenen Kulturbrühe (= Fermentationsbrühe) ein Produkt herzustellen, indem man die in der Kulturbrühe enthaltene Biomasse des Bakteriums vollständig (100%) oder nahezu vollständig d.h. mehr als oder größer als (>) 90%, >95%, >97%, >99% entfernt und die übrigen Bestandteile der Fermentationsbrühe weitgehend d.h. zu 30% - 100%, 40% - 100%, 50% - 100%, 60% - 100%, 70% - 100%, 80% - 100%, oder 90% - 100%, bevorzugt größer gleich ( $\geq$ ) 50%,  $\geq$ 60%,  $\geq$ 70%,  $\geq$ 80%,  $\geq$ 90% oder  $\geq$ 95% oder auch vollständig (100%) im Produkt belässt.

Zur Entfernung oder Abtrennung der Biomasse werden Separationsmethoden wie beispielsweise Zentrifugation, Filtration, Dekantieren, Flockung oder eine Kombination hieraus eingesetzt.

Die erhaltene Brühe wird anschließend mit bekannten Methoden wie beispielsweise mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers, durch Umkehrosmose, durch Nanofiltration oder einer Kombination hieraus eingedickt beziehungsweise konzentriert.

Diese aufkonzentrierte Brühe wird anschließend durch Methoden der Gefrieretrocknung, der Sprühetrocknung, der Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren zu einem vorzugsweise rieselfähigen, feinteiligen Pulver aufgearbeitet. Dieses rieselfähige, feinteilige Pulver kann dann wiederum durch geeignete Kompaktier- oder Granulierverfahren in ein grobkörniges, gut rieselfähiges, lagerbares und weitgehend staubfreies Produkt überführt werden. Das Wasser wird hierbei insgesamt zu mehr als 90% entfernt, sodass der Wassergehalt im Produkt kleiner als 10%, kleiner als 5% beträgt.

Die angegebenen Verfahrensschritte müssen nicht notwendigerweise in der hier aufgeführten Reihenfolge durchgeführt sondern können gegebenenfalls in technisch sinnvoller Weise kombiniert werden.

- 5 Die Analyse von L-Threonin und anderen Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958)) beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC 10 erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind L-Threonin produzierende Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen 15 Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia geeignet. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

- 20 Die Bakterien enthalten mindestens eine Kopie eines thrA-Gens oder Allels, das für eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I kodiert. In der Literatur wird in diesem Zusammenhang auch von „feed back“ resistenten oder auch von desensibilisierten Varianten 25 gesprochen. Derartige Bakterien sind typischerweise resistent gegen das Threoninanalogon α-Amino-β-Hydroxyvaleriansäure (AHV) (Shio und Nakamori, Agricultural and Biological Chemistry 33 (8), 1152-1160 (1969)). Biochemische Untersuchungen zu „feed back“ 30 resistenten Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten sind beispielsweise bei Cohen et al. (Biochemical and Biophysical Research Communications 19(4), 546-550 (1965)) und bei Omori et al. (Journal of Bacteriology 175(3), 785-794 (1993)) beschrieben. Gegebenenfalls wird

die Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I überexprimiert.

Methoden der Überexpression sind im Stand der Technik hinlänglich - beispielsweise bei Makrides et al.

- 5 (Microbiological Reviews 60 (3), 512-538 (1996)) - beschrieben. Durch Verwendung von Vektoren wird die Kopienzahl um mindestens eine (1) Kopie erhöht. Als Vektoren können Plasmide wie beispielsweise in der US 5,538,873 beschrieben verwendet werden. Als Vektoren können 10 ebenfalls Phagen, beispielsweise der Phage Mu, wie in der EP 0 332 448 beschrieben, oder der Phage lambda ( $\lambda$ ) verwendet werden. Eine Erhöhung der Kopienzahl kann auch dadurch erzielt werden, dass eine weitere Kopie in eine weitere Stelle des Chromosoms - beispielsweise in die att- 15 site des Phagen  $\lambda$  (Yu und Court, Gene 223, 77-81 (1998)) - eingebaut wird. In der US 5,939,307 wird beschrieben, dass durch Einbau von Expressionskassetten oder Promotoren wie beispielsweise tac-Promotor, trp-Promotor, lpp-Promotor oder  $P_L$ -Promotor und  $P_R$ -Promotor des Phagen  $\lambda$  stromaufwärts 20 des chromosomalen Threoninoperons eine Erhöhung der Expression erzielt werden konnte. In gleicher Weise können die Promotoren des Phagen T7, die gear-box-Promotoren oder der nar-Promotor verwendet werden. Derartige Expressionskassetten oder Promotoren können auch verwendet werden um, wie in der EP 0 593 792 beschrieben, plasmidgebundene Gene zu überexprimieren. Durch Verwendung des lacI<sup>Q</sup>-Allels lässt sich wiederum die Expression plasmidgebundener Gene kontrollieren (Glascock und Weickert, Gene 223, 221-231 (1998)). Durch Entfernung des 30 Attenuators des Threonin-Operons (Park et al., Biotechnology Letters 24, 1815-1819 (2002)) oder durch Verwendung der thr79-20 Mutation (Gardner, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 76(4), 1706-1710 (1979)) oder durch Mutation des für die Threonyl-t-RNA-Synthetase kodierenden thrS-Gens wie bei Johnson et al. 35 (Journal of Bacteriology 129(1), 66-70 (1977) beschrieben

kann ebenfalls eine Überexpression erzielt werden. Durch die beschriebenen Maßnahmen wird die intrazelluläre Konzentration der jeweiligen Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Proteinvariante um mindestens 10% im Vergleich zum Ausgangsstamm erhöht.

- Ein geeignetes thrA-Allel ist in der US 4,278,765 beschrieben und in Form des Stammes MG442 bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) unter der Zugangsnummer CMIM B-1628 erhältlich. Andere geeignete thrA-Allele sind in der WO 00/09660 und WO 00/09661 beschrieben und bei dem Korean Culture Centre of Microorganisms (KCCM, Seoul, Korea) unter den Zugangsnummern KCCM 10132 und KCCM 10133 erhältlich. Ein weiteres geeignetes thrA-Allel ist in dem Stamm H-4581 vorhanden, der in der US 4,996,147 beschrieben und unter der Zugangsnummer Ferm BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (1-1-1 Higashi, Tsukuba Ibaraki, Japan) erhältlich ist. Schließlich sind weitere thrA-Allele in der US 3,580,810 beschrieben, welche in Form der bei der ATCC hinterlegten Stämme ATCC 21277 und ATCC 21278 erhältlich sind. Ein weiteres Allel ist in der US 3,622,453 beschrieben und in Form des Stammes KY8284 unter der Zugangsnummer ATCC 21272 bei der ATCC erhältlich. Darüber hinaus ist in der WO 02/064808 ein weiteres thrA-Allel beschrieben und in Form von Stamm pGmTN-PPC12 unter der Zugangsnummer KCCM 10236 bei der KCCM hinterlegt.

- Gegebenenfalls können thrA-Allele, die für „feed back“ resistente Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, mit den hinlänglich bekannten Methoden der konventionellen Mutagenese von Zellen unter Verwendung von mutagenen Stoffen beispielsweise N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidin (MNNG) oder Ethylmethansulfonat (EMS) oder mutagenen Strahlen beispielsweise UV-Strahlen und anschließender Selektion von Threoninanalogen

(beispielsweise AHV) resistenten Varianten isoliert werden. Derartige Mutagenesemethoden sind beispielsweise bei Shiio und Nakamori (Agricultural and Biological Chemistry 33 (8), 1152-1160 (1969)) oder bei Saint-Girons und Margerita

- 5 (Molecular and General Genetics 162, 101-107 (1978)) oder in dem bekannten Handbuch von J. H. Miller (A Short Course In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) insbesondere auf den  
10 Seiten 135 bis 156 beschrieben. Shiio und Nakamori behandeln beispielsweise eine Zellsuspension von Escherichia coli für ca. 15 Minuten mit 0,5 mg/ml MNNG in einem 0,1 M Natriumphosphatpuffer von pH 7 bei Raumtemperatur (d. h. im Allgemeinen ca. 16 bis 26°C) zur  
15 Erzeugung von Mutationen. Miller empfiehlt beispielsweise eine Behandlung für 5 bis 60 Minuten mit 30 µl EMS pro 2 ml Zellsuspension in 0,1 M TRIS-Puffer bei pH 7,5 bei einer Temperatur von 37°C. Diese Mutagenesebedingungen können in naheliegender Weise abgeändert werden. Die Selektion von  
20 AHV-resistenten Mutanten erfolgt auf Minimalagar, der typischerweise 2 bis 10 mM AHV enthält. Die entsprechenden Allele können anschließend kloniert und einer Sequenzbestimmung und die von diesen Allelen kodierten Proteinvarianten einer Aktivitätsbestimmung unterzogen werden. Gegebenenfalls können die erzeugten Mutanten auch direkt verwendet werden. Das Wort „direkt“ bedeutet, dass die erzeugte Mutante für die Herstellung von L-Threonin in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden kann oder dass an dieser Mutante weitere Veränderungen zur  
25 30 Erhöhung der Leistungseigenschaften, wie beispielsweise Abschwächung des Threoninabbaus oder Überexpression des Threoninoperons durchgeführt werden können.

- 
- In gleicher Weise können auch Methoden der in-vitro Mutagenese verwendet werden wie sie beispielsweise in dem  
35 bekannten Handbuch von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory

Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1989) beschrieben sind. Entsprechende Methoden sind auch kommerziell in Form sogenannter „kits“ wie beispielsweise der von Papworth et al. (Strategies 9(3), 3-4 (1996)) beschriebene „QuikChange

- 5 Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verfügbar.

Diese Mutagenesemethoden können naturgemäß auch auf andere Gene, Allele oder Stämme beziehungsweise Fragestellungen und Aufgaben, wie beispielsweise der Erzeugung und

- 10 Isolierung von Mutanten, die gegenüber L-Threonin resistent sind, angewendet werden.

Bevorzugt werden solche thrA-Allele, die für Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, die in Gegenwart von 10 mM L-Threonin mindestens 40%, mindestens

- 15 45%, mindestens 50%, mindestens 55% oder mindestens 60%, der Homoserin-Dehydrogenase Aktivität und/oder die in Gegenwart von 1 mM L-Threonin mindestens 60%, mindestens 70%, mindestens 75% oder mindestens 80%, der Homoserin-Dehydrogenase Aktivität im Vergleich zur Aktivität in

- 20 Abwesenheit von L-Threonin aufweisen. Gegebenenfalls beträgt die Aspartatkinase-Aktivität der genannten Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten in Gegenwart von 10 mM L-Threonin mindestens 60%, mindestens 65%, mindestens 70%, mindestens 75% bis oder mindestens 80% der Aktivität in Abwesenheit von L-Threonin.

- 25 Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor enthalten. Die amber-Mutation liegt vorzugsweise an der Position 33 entsprechend der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes. Als amber-Suppressor wird vorzugsweise supE eingesetzt.
- 30 35 Diese Bakterien sind in PCT/EP02/02055 beschrieben. Ein

Stamm, der die beschriebene Mutation im rpoS-Gen und den Suppressor supE enthält, ist unter der Zugangsnummer DSM 15189 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erhältlich.

- 5 Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens kann dem Stand der Technik entnommen werden. Die Nukleotidsequenz des rpoS-Gens entsprechend der Accession No. AE000358 ist als SEQ ID NO. 1 dargestellt. Die Aminosäuresequenz des dazugehörigen RpoS-Genproduktes bzw. Proteins ist in der SEQ ID NO. 2 dargestellt. Die Nukleotidsequenz eines rpoS-Allels, das ein Stopkodon vom Typ amber an der Stelle der Nukleotidsequenz entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-Genproduktes bzw. Proteins, entsprechend SEQ ID NO. 1 bzw. SEQ ID NO. 2, enthält, ist
- 10 15 in SEQ ID NO. 3 wiedergegeben. Der Suppressor supE ist im Stand der Technik beschrieben und als SEQ ID NO. 4 dargestellt.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie Enterobacteriaceae geeignet, die nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen bzw. als Stickstoffquelle zu verwerten. Unter aeroben Kulturbedingungen versteht man solche, bei denen der Sauerstoffpartialdruck in der Fermentationskultur während 90%, bevorzugt 95%, ganz besonders bevorzugt 99% der Fermentationsdauer größer (>) 0% beträgt. Ein derartiger Stamm ist beispielsweise der von Okamoto (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 61(11), 1877-1882 (1997)) beschriebene Stamm KY10935. Stämme, die nicht in der Lage sind Threonin unter Stickstoffabspaltung abzubauen, besitzen im Allgemeinen eine abgeschwächte vom tdh-Gen kodierte Threonin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.103). Das Enzym wurde von Aronson et al. (The Journal of Biological Chemistry 264(9), 5226-5232 (1989)) beschrieben. Abgeschwächte tdh-Gene sind beispielsweise bei Ravnikar und Somerville (Journal of Bacteriology, 1986, 168(1), 434-

436), in der US 5,705,371, in der WO 02/26993 und bei Komatsubara (Bioprocess Technology 19, 467-484 (1994)) beschrieben.

Ein geeignetes tdh-Allel ist in der US 5,538,873

5 beschrieben und in Form des Stammes B-3996 unter der Zugangsnummer 1876 bei der Russischen Nationalsammlung für industrielle Mikroorganismen (VKPM, Moskau, Russland) erhältlich. Ein weiteres tdh-Allel ist in der US 5,939,307 beschrieben und in Form des Stammes kat-13 unter der  
10 Zugangsnummer NRRL B-21593 bei der Agriculture Research Service Patent Culture Collection (Peoria, Illinois, USA) erhältlich. Schließlich ist ein tdh-Allel in der WO 02/26993 beschrieben und in Form des Stammes TH21.97 unter der Zugangsnummer NRRL B-30318 bei der NRRL hinterlegt. Das  
15 für eine defekte Threonin Dehydrogenase kodierende Allel tdh-1::cat1212 ist beim E. coli Genetic Stock Center (New Haven, Conn., USA) unter der Zugangsnummer CGSC 6945 erhältlich.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie

20 Enterobacteriaceae geeignet, die eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit („leaky“-Phänotyp) besitzen, welche durch Gabe von L-Isoleucin in einer Konzentration von mindestens 10, 20 oder 50 mg/l oder L-Threonin in einer Konzentration von mindestens 50, 100 oder 500 mg/l kompensierbar ist.  
25

Unter Bedürftigkeit bzw. Auxotrophie versteht man im Allgemeinen die Tatsache, dass ein Stamm infolge einer Mutation eine Wildtypfunktion beispielsweise eine Enzymaktivität vollständig verloren hat und zum Wachstum

30 die Zugabe eines Supplementes beispielsweise eine Aminosäure benötigt. Von partieller Bedürftigkeit oder partieller Auxotrophie spricht man dann, wenn infolge einer Mutation eine Wildtypfunktion beispielsweise die Aktivität eines Enzyms aus dem Biosyntheseweg einer Aminosäure  
35 beeinträchtigt beziehungsweise abgeschwächt aber nicht

vollständig ausgeschaltet ist. Stämme mit partieller Bedürftigkeit besitzen in Abwesenheit des Supplementes typischerweise eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte, d.h. größer (>) 0% und kleiner (<) 90%, 50%, 25% oder 10%

- 5 Wachstumsgeschwindigkeit. In der Literatur wird dieser Zusammenhang auch als „leaky“-Phänotyp oder „leakyness“ bezeichnet (Griffiths et al.: An Introduction to Genetic Analysis. 6<sup>th</sup> edition, 1996, Freeman and Company, New York, USA).

- 10 Ein Stamm mit einer derartigen partiellen Isoleucin-Bedürftigkeit ist beispielsweise in der WO 01/14525 beschrieben und in Form des Stammes DSM9906 unter der Zugangsnummer KCCM 10168 bei der KCCM hinterlegt. Threonin ausscheidende bzw. produzierende Stämme mit einer

- 15 Isoleucin-Bedürftigkeit besitzen im Allgemeinen eine abgeschwächte vom ilvA-Gen kodierte Threonin-Deaminase (E.C. Nummer 4.3.1.19). Die Threonin-Deaminase ist auch unter dem Namen Threonin-Dehydratase bekannt. Ein abgeschwächtes ilvA-Gen, das eine partielle Isoleucin-

- 20 Auxotrophie bewirkt, ist beispielsweise in der US 4,278,765 beschrieben und in Form des Stammes MG442, hinterlegt unter der Zugangsnummer B-1682, bei der VKPM erhältlich.

- 25 Ein weiteres abgeschwächtes ilvA-Gen ist beispielsweise in der WO 00/09660 beschrieben und in Form des Stammes DSM 9807, hinterlegt unter der Zugangsnummer KCCM-10132, bei der KCCM erhältlich. Weitere abgeschwächte ilvA-Gene sind bei Komatsubara (Bioprocess Technology 19, 467-484 (1994)) beschrieben.

- 30 Die Aminosäuresequenz einer geeigneten und neuen Threonin-Deaminase besteht beispielsweise in der Sequenz von SEQ ID NO. 6 wobei an Position 286 jede Aminosäure außer Glutaminsäure enthalten sein kann. Bevorzugt wird der Austausch Glutaminsäure gegen Lysin (E286K).

Mit dem Begriff „Aminosäure“ sind insbesondere die proteinogenen L-Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-  
5 Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan, L-Prolin und L-Arginin gemeint.

In SEQ ID NO. 8 ist die Aminosäuresequenz einer Threonin-Deaminase angegeben, die an Position 286 die Aminosäure  
10 Lysin enthält; die dazugehörige Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO. 7 dargestellt. Diese enthält an Position 856 die Nukleobase Adenin.

Eine andere geeignete Threonin-Deaminase ist die von Lee et al. (Journal of Bacteriology 185 (18), 5442-5451 (2003)) beschriebene Variante, bei der an Position 97 Serin gegen Phenylalanin (S97F) ausgetauscht ist. Weitere geeignete Threonin-Deaminasen sind die von Fischer und Eisenstein (Journal of Bacteriology 175 (20), 6605-6613 (1993)) beschriebenen Varianten, welche mindestens einen der 20 Aminosäureaustausche ausgewählt aus der Gruppe: Austausch von Asparagin an Position 46 gegen Asparaginsäure (N46D), Austausch von Alanin an Position 66 gegen Valin (A66V), Austausch von Prolin an Position 156 gegen Serin (P156S), Austausch von Glycin an Position 248 gegen Cystein (G248C) und Austausch von Asparaginsäure an Position 266 gegen Tyrosin (D266Y) besitzen.  
25

Durch Insertions- oder Deletions-Mutagenese von mindestens einem Basenpaar beziehungsweise Nukleotid oder durch Insertion oder Deletion von mindestens einem Kodon in der 30 Kodierregion oder durch Einbau eines Stopkodons durch Transitions- oder Transversions-Mutagenese in die Kodierregion des ilvA-Gens lassen sich Allele isolieren, bei denen die Expression des ilvA-Gens im Allgemeinen vollständig ausgeschaltet ist. Diese Methode ist auch auf 35 andere Gene, Allele oder offene Leserahmen wie

beispielsweise das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen übertragbar.

Darüber hinaus sind Bakterien der Familie

Enterobacteriaceae geeignet, die in ihrem Wachstum

- 5 · resistent gegenüber der Hemmung durch L-Threonin und/ oder L-Homoserin sind. Threonin-resistente Stämme und deren Herstellung sind beispielsweise bei Astaurova et al. (Prikladnaya Biokhimia Microbiologiya (1985), 21(5), 485 als englische Übersetzung: Applied Biochemistry and
- 10 Microbiology (1986), 21, 485-490)) beschrieben. Die von Astaurova beschriebene Mutante ist gegenüber 40 mg/ml L-Threonin resistent. Weiterhin ist beispielsweise in der US 5,175,107 der Stamm 472T23 beschrieben, der in Gegenwart von 5 mg/ml L-Threonin wachsen kann und gleichzeitig
- 15 resistent gegen L-Homoserin ist. Der Stamm 472T232 ist unter der Zugangsnummer BKIIM B-2307 bei der VKPM und unter der Nummer ATCC 9801 bei der ATCC erhältlich. Weiterhin ist in der WO 00/09660 der Stamm DSM 9807 beschrieben, der auf einem festen Nährboden wachsen kann, welcher 7% L-Threonin
- 20 enthält. Der Stamm DSM 9807 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10132 bei der KCCM erhältlich. Schließlich ist in der WO 01/14525 der Stamm DSM 9906 beschrieben, der in einem Medium wachsen kann, das 60% bis 70% einer L-Threonin-Fermentationsmutterlauge (L-threonine fermentation mother liquid) enthält. Der Stamm DSM 9906 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10168 bei der KCCM erhältlich.

Es ist bekannt (siehe EP 0994 190 A2 und Livshits et al.

(Research in Microbiology 154, 123-135 (2003)), dass durch

- 30 Verstärkung des rhtA-Gens Resistenz gegenüber L-Threonin und L-Homoserin hervorgerufen wird. Die Verstärkung kann durch Erhöhung der Kopienzahl des Gens oder durch Einsatz der rhtA23-Mutation erzielt werden.

In der EP 0 994 190 A2 wird beschrieben, dass die

Verstärkung des rhtB-Gens Resistenz gegenüber L-Homoserin

- 35 und L-Threonin, insbesondere gegen L-Homoserin bewirkt und

die Threoninproduktion verbessert. Durch Überexpression des RhtB-Genproduktes in einem als N99 bezeichneten Stamm konnte die minimale Hemmkonzentration von 250 µg/ml auf 30000 µg/ml gesteigert werden.

- 5 In der EP 1 013 765 A1 wird beschrieben, dass eine Verstärkung des rhtC-Gens Resistenz gegenüber L-Threonin hervorruft und die Threoninproduktion verbessert. Als resistent gegenüber L-Threonin wird ein Stamm bezeichnet, der in Gegenwart einer Konzentration von mindestens 30  
10 mg/ml L-Threonin auf einem Minimalagar wachsen kann. Es wird weiterhin beschrieben, dass eine Verstärkung des rhtB-Gens Resistenz gegenüber L-Homoserin bewirkt und die Threoninproduktion verbessert. Als resistent gegenüber L-Homoserin wird ein Stamm bezeichnet, der in Gegenwart einer  
15 Konzentration von mindestens 5 mg/ml L-Homoserin auf einem Minimalagar wachsen kann. In der genannten Patentanmeldung werden Stämme beschrieben, die resistent gegenüber 10 mg/ml L-Homoserin und resistent gegenüber 50 mg/ml L-Threonin sind. In der US 4,996,147 wird der Stamm H-4581  
20 beschrieben, der gegen 15 g/l Homoserin resistent ist. Der Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.

- 25 In der EP 1 016 710 A2 wird beschrieben, dass eine Verstärkung des offenen Leserahmen bzw. Gens yfiK oder yeas Resistenz gegenüber L-Threonin und L-Homoserin bewirkt. Durch Überexpression des YfiK-Genproduktes in einem als TG1 bezeichneten Stamm konnte die minimale Hemmkonzentration bezüglich L-Homoserin von 500 µg/ml auf 1000 µg/ml und  
30 bezüglich L-Threonin von 30000 µg/ml auf 40000 µg/ml gesteigert werden. Durch Überexpression des YeaS-Genproduktes konnte die minimale Hemmkonzentration bezüglich L-Homoserin von 500 µg/ml auf 1000 µg/ml und bezüglich L-Threonin von 30000 µg/ml auf 50000 µg/ml  
35 gesteigert werden. In der genannten Patentanmeldung wird

weiterhin gezeigt, dass durch Überexpression des Yfik-Genproduktes die Threoninproduktion verbessert wird.

- Gemäß diesen technischen Anleitungen werden Stämme hergestellt die in Gegenwart von  $\geq$  (mindestens)  $\geq 5$  g/l,  $\geq 5$  10,  $\geq 20$  g/l,  $\geq 30$  g/l,  $\geq 40$  g/l,  $\geq 50$  g/l,  $\geq 60$  g/l und  $\geq 70$  g/l L-Threonin wachsen können, d. h. gegenüber L-Threonin resistent sind, und für die Herstellung von L-Threonin in einem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet sind.
- 5 10 Für das erfindungsgemäße Verfahren sind insbesondere Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:
- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt, und
- 15 b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor.
- 20 Für das erfindungsgemäße Verfahren sind außerdem insbesondere Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:
- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
  - b) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
  - c) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- 25 30 d) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

Für das erfindungsgemäße Verfahren sind ganz besonders Stämme geeignet, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I -  
5 Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt amber-Suppressor,  
10
- c) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
- d) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und  
15
- e) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

Darüber hinaus können die für das erfindungsgemäße Verfahren eingesetzten Bakterien weiterhin eines oder mehrere der folgenden Merkmale aufweisen:

- Abschwächung der vom pckA-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEP-Carboxykinase) wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,
- Abschwächung der vom pgi-Gen kodierten Phoshoglucose-Isomerase (Froman et al. Molecular and General Genetics 25 217(1):126-31 (1989)).
- Abschwächung des vom offenen Leserahmens ytfP kodierten YtfP-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,

• Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjfA kodierten YjfA-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 02/29080 beschrieben,

5 • Abschwächung der vom poxB-Gen kodierten Pruvat-Oxidase wie beispielsweise in der WO 02/36797 beschrieben,

10 • Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjgF kodierten YjgF-Genproduktes wie beispielsweise in der PCT/EP03/14271 beschrieben. Der yjgF-Orf von Escherichia coli ist von Wasinger VC. und Humphery-Smith I. (FEMS Microbiology Letters 169(2): 375-382 (1998)), Volz K. (Protein Science 8(11): 2428-2437 (1999)) und Parsons et al. (Biochemistry 42(1): 80-89 (2003)) beschrieben worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw.

15 Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000495 in öffentlichen Datenbanken verfügbar. Der besseren Übersichtlichkeit halber sind diese als SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 10 dargestellt.

20 • Verstärkung der von den Genen pntA und pntB kodierten Transhydrogenase wie beispielsweise in der EP 0 733 712 A1 beschrieben,

• Verstärkung der von dem pps-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Synthase wie beispielsweise in der EP 0 877 090 A1 beschrieben,

25 • Verstärkung der vom ppc-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxylase wie beispielsweise in der EP 0 723 011 A1 beschrieben, und

30 • Verstärkung des vom rseB-Gen kodierten Regulators RseB wie beispielsweise in der EP 1382685 beschrieben. Der Regulator RseB ist von Missiakas et al. (Molecular Microbiology 24(2), 355-371 (1997)), De Las Penas et al. (Molecular Microbiology 24(2): 373-385 (1997)) und Collinet et al. (Journal of Biological Chemistry 275(43): 33898-33904 (2000)) beschrieben worden. Die

dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000343 in öffentlichen Datenbanken verfügbar.

- Verstärkung des vom galP-Gen kodierten Galaktose-Proton Symporter's (= Galaktose-Permease) wie beispielsweise in der DE 10314618.0 beschrieben. Das galP-Gen und seine Funktion sind von Macpherson et al. (The Journal of Biological Chemistry 258(7): 4390-4396 (1983)) und Venter et al. (The Biochemical Journal 363(Pt 2): 243-252 (2002)) beschrieben worden. Die dazugehörigen Nukleotid bzw. Aminosäuresequenzen sind unter der Zugangsnummer (Accession No.) AE000377 in öffentlichen Datenbanken verfügbar.
- Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können. Genetische Determinanten zur Saccharoseverwertung sind im Stand der Technik beispielsweise in der FR-A-2559781, bei Debabov (In: Proceedings of the IV International Symposium on Genetics of Industrial Microorganisms 1982. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p 254-258), Smith and Parsell (Journal of General Microbiology 87, 129-140 (1975)) und Livshits et al. (In: Conference on Metabolic Bacterial Plasmids. Tartusk University Press, Tallin, Estland (1982), p 132-134 und 144-146) und in der US 5,705,371 beschrieben. Die genetischen Determinanten zur Saccharoseverwertung des von Smith und Parsell beschriebenen Stammes H155 wurden durch Konjugation in eine gegen Nalidixinsäure resistente Mutante von Escherichia coli K-12 überführt und die entsprechende Transkonjugante am 16. März 2004 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) als DSM 16293 hinterlegt. Genetische Determinanten zur Saccharoseverwertung sind ebenfalls in dem in der US 5,631,157 beschriebenen Stamm 472T23 enthalten, der bei der ATCC unter Bezeichnung

ATCC 9801 erhältlich ist. Eine weitere genetische Determinante zur Saccharoseverwertung wurde von Bockmann et al. (Molecular and General Genetics 235, 22-32 (1992)) beschrieben und ist unter der Bezeichnung csc-  
5 System bekannt.

- Verstärkung des vom offenen Leserahmen yedA kodierten YedA-Genproduktes wie beispielsweise in der WO 03/044191 beschrieben.
- Wachstum in Gegenwart mindestens 0,1 bis 0,5 mM oder mindestens 0,5 bis 1 mM Borreolidin (Borreolidinresistenz) wie in US 5,939,307 beschrieben. Der gegen Borreolidin resistente Stamm kat-13 ist unter der Zugangsnummer NRRL B-21593 bei der NRRL erhältlich.  
10
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 2 bis 2,5 g/l oder mindestens 2,5 bis 3 g/l Diaminobernsteinsäure (Diaminobernsteinsäure Resistenz) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen Diaminobernsteinsäure resistente Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.  
15
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 30 bis 40 mM oder mindestens 40 bis 50 mM  $\alpha$ -Methylserin ( $\alpha$ -Methylserin Resistenz) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen  $\alpha$ -Methylserin resistente Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.  
20
- Wachstum in Gegenwart von höchstens 30 mM oder höchstens 40 mM oder höchstens 50 mM Fluorobrenztraubensäure (Fluorobrenztraubensäure Sensitivität) wie in WO 00/09661 beschrieben. Der gegen Fluorobrenztraubensäure sensitive Stamm DSM 9806 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10133 bei der KCCM erhältlich.  
25
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 210 mM oder mindestens 240 mM oder mindestens 270 mM oder mindestens 300 mM L-Glutaminsäure (Glutaminsäure Resistenz) wie in  
30

WO 00/09660 beschrieben. Der gegen Glutaminsäure resistente Stamm DSM 9807 ist unter der Zugangsnummer KCCM-10132 bei der KCCM erhältlich.

- Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für Methionin.  
5 Ein Stamm mit einer mindestens partiellen Methionin Bedürftigkeit ist beispielsweise der in der US 5,017,483 beschriebene Stamm H-4257, der unter der Zugangsnummer FERM BP-984 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich ist. Durch  
10 Zugabe von mindestens 25, 50 oder 100 mg/l L-Methionin ist die Bedürftigkeit kompensierbar.
- Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für m-Diaminopimelinsäure. Ein Stamm mit einer mindestens partiellen m-Diaminopimelinsäure Bedürftigkeit ist  
15 beispielsweise der in der US 5,017,483 beschriebene Stamm H-4257, der unter der Zugangsnummer FERM BP-984 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich ist. Durch Zugabe von  
20 mindestens 25, 50 oder 100 mg/l m-Diaminopimelinsäure ist die Bedürftigkeit kompensierbar.
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 100 mg/l Rifampicin (Rifampicin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen Rifampicin resistente Stamm H-4581 ist unter  
25 der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Lysin (Lysin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen L-Lysin resistente Stamm H-4581 ist unter der  
30 Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.
- Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l Methionin (Methionin Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben.

Der gegen Methionin resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial Science and Technology erhältlich.

- 5 • Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Asparaginsäure (Asparaginsäure Resistenz) wie in US 4,996,147 beschrieben. Der gegen L-Asparaginsäure resistente Stamm H-4581 ist unter der Zugangsnummer FERM BP-1411 beim National Institute of Advanced Industrial  
10 Science and Technology erhältlich.
- Verstärkung der vom pyc-Gen kodierten Pyruvat-Carboxylase. Geeignete pyc-Gene bzw. Allele sind beispielsweise die von *Corynebacterium glutamicum* (WO 99/18228, WO 00/39305 und WO 02/31158), *Rhizobium etli* (US 6,455,284), *Bacillus subtilis* (EP 1092776). Gegebenfalls kann auch das pyc-Gen von weiteren Mikroorganismen verwendet werden, die endogen eine Pyruvat-Carboxylase enthalten, wie beispielsweise *Methanobacterium thermoautotrophicum* oder *Pseudomonas fluorescens*.

Bei Verwendung Saccharose-haltiger Nährmedien werden die Stämme mit genetischen Determinanten zur Saccharoseverwertung ausgerüstet.

- 25 Der Begriff "Verstärkung" beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des offenen Leserahmens, Gens oder Allels bzw. der offenen  
30 Leserahmen, Gene oder Allele um mindestens eine (1) Kopie erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Bei den Maßnahmen der Verstärkung und auch bei den Maßnahmen der Abschwächung wird die Verwendung endogener Gene, Allele oder offener Leserahmen im Allgemeinen bevorzugt. Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen

- 5 Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder offene Leserahmen oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Bei Verwendung von Plasmiden zur Erhöhung der Kopienzahl werden diese gegebenenfalls stabilisiert durch einen oder  
10 mehreren der genetischen Orte (Loci) ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem *parB* Locus des Plasmides R1 beschrieben von Rasmussen et al. (Molecular and General Genetics 209 (1), 122-128 (1987)), Gerdes et al. (Molecular Microbiology 4 (11), 1807-1818 (1990)) und Thistedt und  
15 Gerdes (Journal of Molecular Biology 223 (1), 41-54 (1992)), dem *flm* Locus des F Plasmids beschrieben von Loh et al. (Gene 66 (2), 259-268 (1988)); dem *par* Locus des Plasmids pSC101 beschrieben von Miller et al. (Gene 24 (2-3), 309-315 (1983), dem *cer* Locus des Plasmids ColE1  
20 beschrieben von Leung et al. (DNA 4 (5), 351-355 (1985), dem *par* Locus des Plasmids RK2 beschrieben von Sobecky et al. (Journal of Bacteriology 178 (7), 2086-2093 (1996)) und Roberts and Helinsky (Journal of Bacteriology 174 (24), 8119-8132 (1992)), dem *par* Locus des Plasmids RP4 beschrieben von Eberl et al. (Molecular Microbiology 12 (1), 131-141 (1994)) and dem *parA* Locus des Plasmids R1 beschrieben von Gerdes and Molin (Journal of Molecular Biology 190 (3), 269- 279 (1986)), Dam and Gerdes (Journal of Molecular Biology 236 (5), 1289- 1298 (1994)) and Jensen et al (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95 (15), 8550-8555 (1998)).

Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins oder Enzyms im Allgemeinen um  
35 mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%

oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

- 5 Zur Erzielung einer Verstärkung können beispielsweise die Expression der Gene oder die katalytischen oder funktionellen Eigenschaften der Enzyme oder Proteine erhöht werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.
- 10 So kann beispielsweise die Kopienzahl der entsprechenden Gene um mindestens eine (1) erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise
- 15 wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen L-Threonin-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer
- 20 der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.
- 25 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme oder Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder einen offenen Leserahmen oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein

entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym bzw. Protein oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 5 Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins oder Enzyms im Allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10%, 0 bis 5% oder 0 bis 1% oder 0 bis 0,1% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise  
10 der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Zur Erzielung einer Abschwächung können beispielsweise die Expression der Gene oder offenen Leserahmen oder die katalytischen oder funktionellen Eigenschaften der Enzyme  
15 oder Proteine herabgesetzt bzw. ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls können beide Maßnahmen kombiniert werden.

Die Verringerung der Genexpression kann durch geeignete Kulturführung, durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression oder auch durch  
20 Antisense-RNA Technik erfolgen. Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem  
25 beispielsweise bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)), bei Carrier und Keasling (Biotechnology Progress 15: 58-64 (1999)), Franch und Gerdès (Current Opinion in Microbiology 3: 159-164 (2000)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und  
30 Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung beziehungsweise Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt. Als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und

5 Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Yano et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 5511-5515 (1998)), Wente und Schachmann (Journal of Biological Chemistry 266: 20833-20839 (1991)) genannt.

10 Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen,

15 Insertionen und Deletionen von mindestens einem (1) Basenpaar bzw. Nukleotid in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des durch die Mutation hervorgerufenen Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense mutations“) oder

20 Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“) gesprochen. Die Fehlsinnmutation führt zu einem Austausch einer gegebenen Aminosäure in einem Protein gegen eine andere, wobei es sich insbesondere um einen nicht-konservativen Aminosäureaustausch handelt. Hierdurch wird die Funktionsfähigkeit bzw. Aktivität des Proteins beeinträchtigt und auf einen Wert von 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10%, 0 bis 5% 0 bis 1% oder 0 bis 0,1% reduziert. Die Nichtsinnmutation führt zu einem Stop-Kodon im Kodierbereich des Gens und damit zu einem vorzeitigen

25 Abbruch der Translation. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), die dazu führen, dass falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Entsteht als Folge der Mutation ein Stop-Kodon im Kodierbereich, so führt dies ebenfalls zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation.

Deletionen von mindestens einem (1) oder mehreren Kodonen führen typischerweise ebenfalls zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität beziehungsweise Funktion.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Stämme sind  
5 unter anderem der in der US 5,175,107 beschriebene Stamm  
BKIIM B-3996, der in der WO 00/09660 beschriebene Stamm  
KCCM-10132 und Isoleucin bedürftige Mutanten des in der WO  
98/04715 beschriebenen Stammes kat-13 geeignet.

Gegebenenfalls können Stämme mit den genannten Maßnahmen,  
10 insbesondere durch Einbau eines Stopkodons in das rpoS-Gen,  
beispielsweise eines amber-Kodons an die Stelle  
entsprechend Position 33 der Aminosäuresequenz des RpoS-  
Proteins und gleichzeitigem Einbau eines korrespondierenden  
t-RNA-Suppressors beispielsweise supE an das  
15 erfindungsgemäße Verfahren adaptiert werden.

Für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Stämme können  
auch dadurch identifiziert werden, dass man die  
Nukleotidsequenz des rpoS-Gens in einem L-Threonin  
ausscheidenden Stamm von Escherichia coli bestimmt. Hierzu  
20 wird das rpoS-Gen kloniert oder mit Hilfe der Polymerase-  
Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und die Nukleotidsequenz  
bestimmt. Enthält das rpoS-Gen ein Stopkodon, so wird in  
einem zweiten Schritt geprüft, ob er ebenfalls einen  
korrespondierenden t-RNA-Suppressor enthält. Gegebenenfalls  
wird der auf diese Weise identifizierte Stamm mit den oben  
beschriebenen Eigenschaften wie beispielsweise  
Überexpression des thrA-Allels, Abschwächung des unter  
aeroben Kulturbedingungen stattfindenden Threoninabbaus,  
Einführung einer mindestens partiellen Isoleucin-  
30 Bedürftigkeit bewirkenden Mutation in das ilvA-Gen oder  
Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin oder  
mit einer oder mehreren der weiterhin aufgeführten  
Eigenschaften versehen.

Die genannten Eigenschaften beziehungsweise Merkmale können durch Transformation, Transduktion oder Konjugation in gewünschte Stämme übertragen werden.

- Bei der Methode der Transformation wird isoliertes  
5 genetisches Material typischerweise DNA in einen Empfängerstamm eingeführt. Bei Bakterien der Familie Enterobacteriaceae wie z. B. Escherichia coli wird die DNA dazu in vitro in Plasmid- oder Phagen-DNA eingebaut und diese dann in den Empfängerstamm überführt. Die  
10 entsprechenden Methoden und Arbeitsvorschriften sind im Stand der Technik hinlänglich bekannt und beispielsweise im Handbuch von J. Sambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989) ausführlich beschrieben.
- 15 Mit Hilfe der Methode des Gen- bzw. Allelaustauschs unter Verwendung konditional replizierender Plasmide können definierte Mutationen in geeignete Stämme transferiert werden. Bei einer definierten Mutation ist mindestens die Position im Chromosom, vorzugsweise die exakte Position der  
20 Veränderung der Nukleobase(n) und die Art der Änderung (Substitution, d.h. Transition oder Transversion, Insertion oder Deletion) bekannt. Gegebenenfalls wird die entsprechende DNA zunächst mit gebräuchlichen Methoden sequenziert. Eine gebräuchliche Methode zur Erzielung eines  
25 Gen- bzw. eines Allelaustauschs ist die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)) beschriebene, bei der das temperatursensitiv replizierende pSC101-Derivat pMAK705 verwendet wird. Mit dieser Methode können Allele vom Plasmid in das Chromosom überführt  
30 werden. In gleicher Weise können chromosomal Allele auf das Plasmid überführt werden. Andere im Stand der Technik beschriebene Methoden wie beispielsweise die von Martinez-Morales et al. (Journal of Bacteriology 181: 7143-7148 (1999)), die von Boyd et al. (Journal of Bacteriology 182:

842-847 (2000)) oder die in der WO 01/77345 beschriebene Methode können gleichfalls benutzt werden.

Diese Methode kann unter anderem eingesetzt werden, um rpoS-Allele, die beispielsweise Stop-Kodons enthalten, 5 Suppressorgene wie beispielsweise supE, abgeschwächte tdh-Allele, die beispielsweise Deletionen enthalten, abgeschwächte ilvA-Allele, thrA-Allele, die für „feed back“ resistente Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I Varianten kodieren, die rhtA23-Mutation, abgeschwächte pck-10 Allele, abgeschwächte Allele des ytfP-ORF's, abgeschwächte yjfA-ORF's, abgeschwächte poxB-Allele, abgeschwächte yjgF-ORF's in gewünschte Stämme einzufügen.

Bei der Methode der Transduktion wird ein genetisches Merkmal von einem Donorstamm unter Verwendung eines 15 Bacteriophagen in einen Empfängerstamm übertragen. Diese Methode gehört zum Stand der Technik und ist in Lehrbüchern wie beispielsweise dem von E. A. Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4th ed., Springer Verlag, New York, USA, 2000) beschrieben.

20 Bei Escherichia coli wird typischerweise der Bacteriophage P1 für die generalisierte Transduktion (generalized transduction) (Lennox, Virology 1, 190-206 (1955) verwendet. Eine Zusammenfassung über die Methode der generalisierten Transduktion gibt der Aufsatz „Generalized 25 Transduktion“ von M. Masters, der im Lehrbuch von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996) enthalten ist. Praktische Anleitungen sind beispielsweise im Handbuch von J. H. Miller (A Short Course 30 In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 1992) oder dem Handbuch von P. Gerhardt „Manual of Methods for General Bacteriology“ (American Society for Microbiology, 35 Washington, DC, USA, 1981) enthalten.

Mit Hilfe der Transduktion lassen sich Resistenz vermittelnde oder andere dominante genetische Eigenschaften wie beispielsweise Antibiotika-Resistenz (zum Beispiel Kanamycin-Resistenz, Chloramphenicol-Resistenz, Rifampicin-

- 5 Resistenz oder Borreolidin-Resistenz), Resistenz gegen Antimetabolite (zum Beispiel  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure-Resistenz,  $\alpha$ -Methyl-Serin-Resistenz oder Diaminobernsteinsäure-Resistenz), Resistenz gegen Metabolite (zum Beispiel Threonin-Resistenz, Homoserin-  
10 Resistenz, Glutaminsäure-Resistenz, Methionin-Resistenz, Lysin-Resistenz oder Asparaginsäure-Resistenz) oder auch die Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung in geeignete Empfängerstämme übertragen.

Die Methode der Transduktion ist ebenfalls geeignet um

- 15 sogenannte nicht selektierbare genetische Eigenschaften wie beispielsweise Aminosäure-Auxotrophien bzw. Bedürftigkeiten (zum Beispiel Isoleucin-Bedürftigkeit, Methionin-Bedürftigkeit oder m-Diaminopimelinsäure-Bedürftigkeit), Vitamin-Bedürftigkeiten oder Sensitivität gegen  
20 Antimetabolite (zum Beispiel Fluorobrenztraubensäure-Sensitivität) in Empfängerstämme einzuführen. Hierzu verwendet man E. coli Stämme, die in einem Abstand von ungefähr einer Minute auf dem Chromosom das Transposon Tn10 oder Tn10kan enthalten. Diese Stämme sind unter dem Begriff „Singer Kollektion“ oder „Singer/Gross Kollektion“ bekannt (Singer et al., Microbiological Reviews 53, 1-24, 1989). Diese Stämme sind beim E. coli Genetic Stock Center der Universität Yale (New Haven, CT, USA) allgemein verfügbar. Weitere Angaben findet man in dem Aufsatz von M. K. B.  
25 Berlyn et al. "Linkage Map of Escherichia coli K-12, Edition 9", der im Lehrbuch von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996) enthalten ist. In ähnlicher Weise lassen sich nicht direkt selektierbare  
30 genetische Eigenschaften (zum Beispiel Fluorobrenztraubensäure-Sensitivität, Suppressormutationen)

und auch solche, deren Mutationsort nicht bekannt ist, in verschiedene Stämme übertragen. Anleitungen hierzu findet man unter anderem in dem Lehrbuch von J. Scaife et al. (Genetics of Bacteria, Academic Press, London, UK, 1985), 5 in dem oben erwähnten Aufsatz von M. Masters und in dem oben erwähnten Handbuch von J. H. Miller. Das mit dem Transposon Tn10 eingeführte Tetrazyklin-Resistenzgen kann gegebenenfalls mit der von Bochner et al. (Journal of Bacteriology 143, 926-933 (1980)) beschriebenen Methode 10 wieder entfernt werden.

Bei der Methode Konjugation wird genetisches Material durch Zell-Zell Kontakt von einem Donor in einen Empfänger übertragen. Der konjugative Transfer des F-Faktors (F: ferility) , der konjugative Gentransfer unter Verwendung 15 von Hfr-Stämmen (Hfr: high frequency of recombination) und Stämmen, die einen F'-Faktor (F': F prime) tragen, gehören zu den klassischen Verfahren der Genetik. Zusammenfassende Darstellungen findet man unter anderem in dem Standardwerk von F. C. Neidhard (Escherichia coli and Salmonella 20 Cellular and Molecular Biology, 2nd ed., ASM Press, Washington, DC, USA, 1996). Praktische Anleitungen sind beispielsweise im Handbuch von J. H. Miller (A Short Course In Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor 25 Laboratory Press, New York, USA, 1992) oder dem Handbuch von P. Gerhardt „Manual of Methods for General Bacteriology“ (American Society for Microbiology, Washington, DC, USA, 1981) enthalten. F-, F' und Hfr-Stämme sind beim E. coli Genetic Stock Center der Universität Yale 30 (New Haven, CT, USA) allgemein verfügbar.

Die Methode der Konjugation wurde beispielsweise eingesetzt, um die von Thèze und Saint-Girons (Journal of Bacteriology 118, 990-998 (1974)) beschriebene Mutation thrC1010 in den Stamm MG442 (Debabov, Advances in 35 Biochemical Engineering/Biotechnology 79, 113-136 (2003) zu

transferieren. Im Stand der Technik beispielsweise bei Schmid et al. (Journal of Bacteriology 151, 68-76 (1982)) oder Smith und Parsell (Journal of General Microbiology 87, 129-140 (1975)) und Livshits et al. (In: Conference on

- 5 Metabolic Bacterial Plasmids. Tartusk University Press, Tallin, Estland (1982), p 132-134 und 144-146) sind konjugative Plasmide beschrieben, die die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung tragen. So berichtet Debabov (In: Proceedings of the IVth International Symposium on Genetics  
10 of Industrial Microorganisms 1982. Kodansha Ltd, Tokyo, Japan, p 254-258) von der Konstruktion Threonin produzierender Stämme, in die mit Hilfe der Konjugation die Fähigkeit zur Saccharoseverwertung eingebaut wurde.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet,  
5 dass man

- a) das Bakterium in mindestens einem ersten Nährmedium inkuliert und kultiviert,
- b) anschließend mindestens ein weiteres Nährmedium oder weitere Nährmedien in einem oder mehreren Zufütterungsströmen der Kultur kontinuierlich zuführt, wobei das weitere Nährmedium oder die weiteren Nährmedien mindestens eine Kohlenstoffquelle, mindestens eine Stickstoffquelle und mindestens eine Phosphorquelle enthalten, unter Bedingungen die die Bildung von L-Threonin erlauben und gleichzeitig der Kultur Kulturbrühe mit mindestens einem oder mehreren Entnahmeströmen entnimmt, der oder die im wesentlichen dem Zufütterungsstrom oder der Summe der Zufütterungsströme entspricht/entsprechen, wobei  
15
- c) die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der kontinuierlichen Kultivierung in Schritt (b) bei maximal 30 g/l eingestellt wird.

20 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Satzverfahren (batch) durchgeführt wird.

25 3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Kultivierungsschritt (a) nach dem Zulaufverfahren (fed batch) durchgeführt wird, wobei mindestens ein Zusatz-Nährmedium eingesetzt wird.  
30

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.
6. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass, bezogen auf den Beginn des Satzverfahrens, das weitere oder die weiteren Nährmedien nach >0 bis 20 Stunden zugeführt wird (werden).
7. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass, bezogen auf den Beginn des Zulaufverfahrens, das weitere oder die weiteren Nährmedien nach >0 bis 80 Stunden zugeführt wird (werden).
8. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Kohlenstoffquelle um eine oder mehrere der Verbindungen ausgewählt aus der Gruppe Saccharose, Melasse aus Zuckerrüben oder Zuckerrohr, Fruktose, Glukose, Stärkehydrolysat, Cellulosehydrolysat, Arabinose, Maltose, Xylose, Essigsäure, Ethanol und Methanol handelt.
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Stickstoffquelle um eine oder mehrere organische, Stickstoff-haltige Stoffe oder Stoffgemische ausgewählt aus der Gruppe Peptone, Hefeextrakte, Fleischextrakte, Malzextrakte, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff und/oder um eine oder mehrere der anorganischen Verbindungen

ausgewählt aus der Gruppe Ammoniak, Ammonium-haltige Salze und Salze der Salpetersäure handelt.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei Ammonium-haltigen Salzen und Salzen  
5 der Salpetersäure um Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid,  
Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat, Ammoniumnitrat,  
Kaliumnitrat und Kaliumnatriumnitrat handelt.
11. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei der Phosphorquelle um Phosphorsäure  
10 oder deren Polymere oder um Phytinsäure oder deren  
Alkali- oder Erdalkalisalze handelt.
12. Verfahren gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei den Alkalalisalzen der Phosphorsäure um  
15 Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat  
oder die entsprechenden Natrium-haltigen Salze  
handelt.
13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass die Geschwindigkeit des Entnahmestroms oder der  
Entnahmeströme 80% - 120%, 90% - 110% des  
20 Zufütterungsstroms oder der Summe der  
Zufütterungsströme entspricht.
14. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass der Beginn der Entnahme oder der Entnahmen  
zeitgleich oder zeitlich versetzt zur Zufütterung oder  
25 der Summe der Zufütterungen erfolgt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass es sich bei den Bakterien der Familie  
Enterobacteriaceae um die Art Escherichia coli  
handelt.
- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae  
mindestens ein thrA-Gen oder Allel enthält, das für

eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I -  
Homoserindehydrogenase I kodiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass das Bakterium der Familie Enterobacteriaceae ein  
5 Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und  
amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-  
Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor,  
ochre-Suppressor und amber-Suppressor, bevorzugt  
amber-Suppressor enthält.
- 10 18. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass der Zufütterungsstrom oder die Summe der  
Zufütterungsströme mit einer Geschwindigkeit  
entsprechend einer mittleren Verweilzeit von kleiner  
30 Stunden, kleiner 25, kleiner 20 Stunden  
15 hinzugeführt wird.
19. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass in dem zugeführtem Nährmedium oder den  
zugeführten Nährmedien ein Phosphor zu  
Kohlenstoffverhältnis (P/C Verhältnis) von maximal 4;  
20 von maximal 3; von maximal 2; von maximal 1,5; von  
maximal 1; von maximal 0,7; von maximal 0,5; maximal  
0,48; maximal 0,46; maximal 0,44; maximal 0,42;  
maximal 0,40; maximal 0,38; maximal 0,36; maximal  
0,34; maximal 0,32; maximal 0,30 eingestellt wird.
- 25 20. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,  
dass die entnommene Kulturbrühe mit Sauerstoff oder  
einem sauerstoffhaltigen Gas versehen wird bis die  
Konzentration der Kohlenstoffquelle unter 2 g/l; unter  
1 g/l; unter 0,5 g/l sinkt.
- 30 21. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet,  
dass das gebildete L-Threonin gereinigt wird.
22. Verfahren gemäß Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet,  
dass man zunächst die Biomasse aus der entnommenen

Kultur in Schritt (b) zu mindestens 90% entfernt und anschließend das Wasser zu mindestens 90% entfernt.

23. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 20, 5 10 oder 5 g/l eingestellt wird.
24. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 10 oder 2 g/l eingestellt wird.
25. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 5 g/l eingestellt wird.
- 15 26. Verfahren gemäß Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Kohlenstoffquelle während der Kultur bei maximal 2 g/l eingestellt wird.
27. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch 20 gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 31 % beträgt.
28. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch 25 gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 37 % beträgt.
29. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch 30 gekennzeichnet, dass die Ausbeute des gebildeten L-Threonins, bezogen auf die eingesetzte Kohlenstoffquelle, mindestens 42 % beträgt.

30. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 1,5 bis 2,5 g/l pro Std. gebildet wird.
- 5 31. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 2,5 bis mehr als 3,5 g/l pro Std. gebildet wird.
- 10 32. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 3,5 bis 5,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 15 33. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Zulaufverfahren im Kultivierungsschritt (a) angewandt wird, und dass L-Threonin mit einer Raum-Zeit-Ausbeute von mindestens 5,0 bis mehr als 8,0 g/l pro Std. gebildet wird.
- 20 34. Saccharose verwertende Transkonjugante von Escherichia coli K-12 hinterlegt als DSM 16293 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland).
- 25 35. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:
  - a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserin-dehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt, und
  - , b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor.
- 30

36. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- b) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen,
- c) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- d) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

37. Verfahren gemäß Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass man Stämme einsetzt, die mindestens folgende Merkmale aufweisen:

- a) eine Threonin-insensitive Aspartatkinase I - Homoserindehydrogenase I, welche gegebenenfalls überexprimiert vorliegt,
- b) ein Stopkodon ausgewählt aus der Gruppe opal, ochre und amber, bevorzugt amber im rpoS-Gen und einen t-RNA-Suppressor ausgewählt aus der Gruppe opal-Suppressor, ochre-Suppressor und amber-Suppressor,
- c) nicht in der Lage sind unter aeroben Kulturbedingungen Threonin abzubauen, bevorzugt durch Abschwächung der Threonin-Dehydrogenase,
- d) eine mindestens partielle Isoleucin-Bedürftigkeit, und
- e) Wachstum in Gegenwart von mindestens 5 g/l Threonin.

38. Verfahren gemäß Anspruch 35, 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, dass der eingesetzte Stamm zusätzlich eines oder mehrere der Merkmale ausgewählt aus der Gruppe

- 5        38.1 Abschwächung der vom pckA-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase,
- 10      38.2 Abschwächung der vom pgi-Gen kodierten Phoshoglucose-Isomerase,
- 15      38.3 Abschwächung des vom offenen Leserahmens ytfP kodierten YtfP-Genproduktes,
- 25      38.4 Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjfA kodierten YjfA-Genproduktes,
- 38.5 Abschwächung der vom poxB-Gen kodierten Pruvat-Oxidase,
- 38.6 Abschwächung des vom offenen Leserahmen yjgF kodierten YjgF-Genproduktes,
- 38.7 Verstärkung der von den Genen pntA und pntB kodierten Transhydrogenase,
- 38.8 Verstärkung der von dem pps-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Synthase,
- 38.9 Verstärkung der vom ppc-Gen kodierten Phosphoenolpyruvat-Carboxylase,
- 38.10 Verstärkung des vom rseB-Gen kodierten Regulators RseB,
- 38.11 Verstärkung des vom galP-Gen kodierten Galaktose-Proton Symporter's,
- 38.12 Fähigkeit Saccharose als Kohlenstoffquelle verwenden zu können,

- 38.13 Verstärkung des vom offenen Leserahmens yedA kodierten YedA-Genproduktes,
- 38.14 Wachstum in Gegenwart mindestens 0,1 bis 0,5 mM oder mindestens 0,5 bis 1 mM Borreolidin  
5 (Borreolidinresistenz) ,
- 38.15 Wachstum in Gegenwart von mindestens 2 bis 2,5 g/l oder mindestens 2,5 bis 3 g/l Diaminobernsteinsäure (Diaminobernsteinsäure Resistenz),
- 10 38.16 Wachstum in Gegenwart von mindestens 30 bis 40 mM oder mindestens 40 bis 50 mM  $\alpha$ -Methylserin ( $\alpha$ -Methylserin Resistenz),
- 15 38.17 Wachstum in Gegenwart von höchstens 30 mM oder höchstens 40 mM oder höchstens 50 mM Fluorobrenztraubensäure (Fluorobrenztraubensäure Sensitivität),
- 20 38.18 Wachstum in Gegenwart von mindestens 210 mM oder mindestens 240 mM oder mindestens 270 mM oder mindestens 300 mM L-Glutaminsäure (Glutaminsäure Resistenz),
- 38.19 Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für Methionin,
- 38.20 Eine mindestens partielle Bedürftigkeit für m-Diaminopimelinsäure,
- 25 38.21 Wachstum in Gegenwart von mindestens 100 mg/l Rifampicin (Rifampicin Resistenz),
- 38.22 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Lysin (Lysin Resistenz),
- 38.23 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l Methionin (Methionin Resistenz),  
30

38.24 Wachstum in Gegenwart von mindestens 15 g/l L-Asparaginsäure (Asparaginsäure Resistenz), und

38.25 Verstärkung der vom pyc-Gen kodierten Pyruvat-Carboxylase

5 enthalten.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein verbessertes Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Threonin unter Verwendung von L-Threonin produzierenden Bakterien der Familie

- 5 Enterobacteriaceae.

## SEQUENZPROTOKOLL

5 &lt;110&gt; Degussa AG

&lt;120&gt; Verfahren zur Herstellung von L-Threonin

10 &lt;130&gt; 030217BT

15 &lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

20 <210> 1  
<211> 993  
<212> DNA  
<213> Escherichia coli25 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(990)  
30 <223> rpoS-Gen

35	atg agt cag aat acg ctg aaa gtt cat gat tta aat gaa gat gcg gaa Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu 1               5               10               15	48
40	ttt gat gag aac gga gtt gag gtt ttt gac gaa aag gcc tta gta gaa Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu 20               25               30	96
45	cag gaa ccc agt gat aac gat ttg gcc gaa gag gaa ctg tta tcg cag Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Leu Leu Ser Gln 35               40               45	144
50	gga gcc aca cag cgt gtg ttg gac gcg act cag ctt tac ctt ggt gag Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu 50               55               60	192
55	att ggt tat tca cca ctg tta acg gcc gaa gaa gtt tat ttt gcg Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Val Tyr Phe Ala 65               70               75               80	240
60	cgt cgc gca ctg cgt gga gat gtc gcc tct cgc cgc cgg atg atc gag Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu 85               90               95	288
	agt aac ttg cgt ctg gtg gta aaa att gcc cgc cgt tat ggc aat cgt Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg 100              105              110	336

	ggt ctg gcg ttg ctg gac ctt atc gaa gag ggc aac ctg ggg ctg atc Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile	384
	115                   120                   125	
5	cgc gcg gta gag aag ttt gac ccg gaa cgt ggt ttc cgc ttc tca aca Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr	432
	130                   135                   140	
10	tac gca acc tgg tgg att cgc cag acg att gaa ccg gcg att atg aac Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn	480
	145                   150                   155                   160	
15	caa acc cgt act att cgt ttg ccg att cac atc gta aag gag ctg aac Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn	528
	165                   170                   175	
20	gtt tac ctg cga acc gca cgt gag ttg tcc cat aag ctg gac cat gaa Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu	576
	180                   185                   190	
25	cca agt gcg gaa gag atc gca gag caa ctg gat aag cca gtt gat gac Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp	624
	195                   200                   205	
30	gtc agc cgt atg ctt cgt ctt aac gag cgc att acc tcg gta gac acc Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr	672
	210                   215                   220	
35	ccg ctg ggt ggt gat tcc gaa aaa gcg ttg ctg gac atc ctg gcc gat Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp	720
	225                   230                   235                   240	
40	gaa aaa gag aac ggt ccg gaa gat acc acg caa gat gac gat atg aag Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys	768
	245                   250                   255	
45	cag agc atc gtc aaa tgg ctg ttc gag ctg aac gcc aaa cag cgt gaa Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu	816
	260                   265                   270	
50	gtg ctg gca cgt cga ttc ggt ttg ctg ggg tac gaa gcg gca aca ctg Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu	864
	275                   280                   285	
55	gaa gat gta ggt cgt gaa att ggc ctc acc cgt gaa cgt gtt cgc cag Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln	912
	290                   295                   300	
60	att cag gtt gaa ggc ctg cgc cgt ttg cgc gaa atc ctg caa acg cag Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln	960
	305                   310                   315                   320	
	ggg ctg aat atc gaa gcg ctg ttc cgc gag taa Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu	993
	325                   330	
	<210> 2	
	<211> 330	
	<212> PRT	
	<213> Escherichia coli	

<400> 2  
Met Ser Gln Asn Thr Leu Lys Val His Asp Leu Asn Glu Asp Ala Glu  
1 5 10 15

5 Phe Asp Glu Asn Gly Val Glu Val Phe Asp Glu Lys Ala Leu Val Glu  
20 25 30

Gln Glu Pro Ser Asp Asn Asp Leu Ala Glu Glu Glu Leu Leu Ser Gln  
10 35 40 45

Gly Ala Thr Gln Arg Val Leu Asp Ala Thr Gln Leu Tyr Leu Gly Glu  
50 55 60

Ile Gly Tyr Ser Pro Leu Leu Thr Ala Glu Glu Glu Val Tyr Phe Ala  
15 65 70 75 80

Arg Arg Ala Leu Arg Gly Asp Val Ala Ser Arg Arg Arg Met Ile Glu  
85 90 95

Ser Asn Leu Arg Leu Val Val Lys Ile Ala Arg Arg Tyr Gly Asn Arg  
20 100 105 110

Gly Leu Ala Leu Leu Asp Leu Ile Glu Glu Gly Asn Leu Gly Leu Ile  
25 115 120 125

Arg Ala Val Glu Lys Phe Asp Pro Glu Arg Gly Phe Arg Phe Ser Thr  
130 135 140

Tyr Ala Thr Trp Trp Ile Arg Gln Thr Ile Glu Arg Ala Ile Met Asn  
30 145 150 155 160

Gln Thr Arg Thr Ile Arg Leu Pro Ile His Ile Val Lys Glu Leu Asn  
165 170 175

Val Tyr Leu Arg Thr Ala Arg Glu Leu Ser His Lys Leu Asp His Glu  
35 180 185 190

Pro Ser Ala Glu Glu Ile Ala Glu Gln Leu Asp Lys Pro Val Asp Asp  
195 200 205

Val Ser Arg Met Leu Arg Leu Asn Glu Arg Ile Thr Ser Val Asp Thr  
40 210 215 220

Pro Leu Gly Gly Asp Ser Glu Lys Ala Leu Leu Asp Ile Leu Ala Asp  
45 225 230 235 240

Glu Lys Glu Asn Gly Pro Glu Asp Thr Thr Gln Asp Asp Asp Met Lys  
245 250 255

Gln Ser Ile Val Lys Trp Leu Phe Glu Leu Asn Ala Lys Gln Arg Glu  
50 260 265 270

Val Leu Ala Arg Arg Phe Gly Leu Leu Gly Tyr Glu Ala Ala Thr Leu  
55 275 280 285

Glu Asp Val Gly Arg Glu Ile Gly Leu Thr Arg Glu Arg Val Arg Gln  
290 295 300

Ile Gln Val Glu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Glu Ile Leu Gln Thr Gln  
60 305 310 315 320

Gly Leu Asn Ile Glu Ala Leu Phe Arg Glu  
 325 330

5 <210> 3  
 <211> 993  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

10 <220>  
 <221> Allel  
 <222> (1)..(990)  
 <223> rpoS-Allel

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (97)..(99)  
 <223> amber-Codon

20 <400> 3  
 atgagtcaga atacgctgaa agttcatgat ttaaatgaag atgcggaatt tgatgagaac 60

25 ggagttgagg ttttgacga aaaggccta gtagaatagg aacccagtga taacgatttg 120  
 gccgaagagg aactgttatac gcagggagcc acacagcgtg tggacgc gactcagctt 180  
 taccttggtg agattggta ttcaccactg ttaacggccg aagaagaagt ttatggcg 240  
 30 cgtcgccac tgcgtggaga tgcgtcctct cgccgcggg tgatcgagag taacttgcgt 300  
 ctgggtgtaa aaattgcccggcgttatggc aatcggttgc tggcgttgc ggaccttatac 360  
 35 gaagagggca acctggggct gatccgcgcg gtagagaagt ttgaccggaa acgtggttc 420  
 cgcttctcaa catacgcaac ctggtgatt cgccagacga ttgaacgggc gattatgaac 480  
 40 caaacccgtt ctattcgaaa gccgattcac atcgtaaagg agctgaacgt ttacctgcga 540  
 accgcacgtg agttgtccca taagctggac catgaaccaa gtgcggaaaga gatcgagag 600  
 caactggata agccagttga tgacgtcagc cgtatgcttc gtcttaacga ggcattacc 660  
 45 tcggtagaca cccccctggg tggtgattcc gaaaaagcgt tgctggacat cctggccgat 720  
 gaaaaagaga acggtccggaa agataccacg caagatgacg atatgaagca gagcatcg 780  
 50 aaatggctgt tcgagctgaa cgccaaacag cgtgaagtgc tggcacgtcg attcggtttg 840  
 ctgggttacg aagcggcaac actggaaat gtaggtcgtg aaattggcct cacccgtgaa 900  
 cgtgttcgcc agattcaggt tgaaggcctg cgccgttgc gcaaatacct gcaaacgcag 960  
 55 gggctgaata tcgaagcgct gttccgcgag taa 993

<210> 4  
 <211> 75  
 <212> DNA  
 60 <213> Escherichia coli

<220>  
<221> tRNA  
<222> (1)..(75)  
<223> supE-Allel

	<400>	4			
	tgggtatcg ccaagcgta aggcaccgga ttcttaattcc ggcattccga ggttcgaatc				60
10	ctcgtacccc agcca				75
	<210>	5			
	<211>	1545			
	<212>	DNA			
15	<213>	Escherichia coli			
	<220>				
	<221>	CDS			
20	<222>	(1)..(1542)			
	<223>	ilvA-Gen			
	<400>	5			
	atg gct gac tcg caa ccc ctg tcc ggt gct ccg gaa ggt gcc gaa tat				48
25	Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr				
	1	5	10	15	
	tta aga gca gtg ctg cgc gcg ccg gtt tac gag gcg gcg cag gtt acg				96
	Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr				
30	20	25	30		
	ccg cta caa aaa atg gaa aaa ctg tcg tcg cgt ctt gat aac gtc att				144
	Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile				
	35	40	45		
	ctg gtg aag cgc gaa gat cgc cag cca gtg cac agc ttt aag ctg cgc				192
	Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg				
	50	55	60		
40	ggc gca tac gcc atg atg gcg ggc ctg acg gaa gaa cag aaa gcg cac				240
	Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His				
	65	70	75	80	
45	ggc gtg atc act gct tct gcg ggt aac cac gcg cag ggc gtc gcg ttt				288
	Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe				
	85	90	95		
50	tct tct gcg cgg tta ggc gtg aag gcc ctg atc gtt atg cca acc gcc				336
	Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala				
	100	105	110		
	acc gcc gac atc aaa gtc gac gcg gtg cgc ggc ttc ggc ggc gaa gtg				384
	Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Glu Val				
	115	120	125		
55	ctg ctc cac ggc gcg aac ttt gat gaa gcg aaa gcc aaa gcg atc gaa				432
	Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu				
	130	135	140		
60	ctg tca cag cag cag ggg ttc acc tgg gtg ccg ccg ttc gac cat ccg				480
	Ileu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro				
	145	150	155	160	

	atg gtg att gcc ggg caa ggc acg ctg gcg ctg gaa ctg ctc cag cag Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln 165 170 175	528
5	gac gcc cat ctc gac cgc gta ttt gtg cca gtc ggc ggc ggc ggt ctg Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Leu 180 185 190	576
10	gct gct ggc gtg gcg gtg ctg atc aaa caa ctg atg ccg caa atc aaa Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys 195 200 205	624
15	gtg atc gcc gta gaa gcg gaa gac tcc gcc tgc ctg aaa gca gcg ctg Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu 210 215 220	672
20	gat gcg ggt cat ccg gtt gat ctg ccg cgc gta ggg cta ttt gct gaa Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu 225 230 235 240	720
25	ggc gta gcg gta aaa cgc atc ggt gac gaa acc ttc cgt tta tgc cag Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln 245 250 255	768
30	gag tat ctc gac gac atc atc acc gtc gat agc gat gcg atc tgt gcg Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala 260 265 270	816
35	gcg atg aag gat tta ttc gaa gat gtg cgc gcg gtg gcg gaa ccc tct Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Glu Pro Ser 275 280 285	864
40	ggc gcg ctg gcg ctg gcg gga atg aaa aaa tat atc gcc ctg cac aac Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn 290 295 300	912
45	att cgc ggc gaa cgg ctg gcg cat att ctt tcc ggt gcc aac gtg aac Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn 305 310 315 320	960
50	ttc cac ggc ctg cgc tac gtc tca gaa cgc tgc gaa ctg ggc gaa cag Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln 325 330 335	1008
55	cgt gaa gcg ttg ttg gcg gtg acc att ccg gaa gaa aaa ggc agc ttc Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe 340 345 350	1056
60	ctc aaa ttc tgc caa ctg ctt ggc ggg cgt tcg gtc acc gag ttc aac Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn 355 360 365	1104
	tac cgt ttt gcc gat gcc aaa aac gcc tgc atc ttt gtc ggt gtg cgc Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg 370 375 380	1152
	ctg agc cgc ggc ctc gaa gag cgc aaa gaa att ttg cag atg ctc aac Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn 385 390 395 400	1200

	gac ggc ggc tac agc gtg gtt gat ctc tcc gac gac gaa atg gcg aag Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys 405 410 415	1248
5	cta cac gtg cgc tat atg gtc ggc gga cgt cca tcg cat ccg ttg cag Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln 420 425 430	1296
10	gaa cgc ctc tac agc ttc gaa ttc ccg gaa tca ccg ggc gcg ctg ctg Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu 435 440 445	1344
15	cgc ttc ctc aac acg ctg ggt acg tac tgg aac att tct ttg ttc cac Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His 450 455 460	1392
20	tat cgc agc cat ggc acc gac tac ggg cgc gta ctg gcg gcg ttc gaa Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu 465 470 475 480	1440
	ctt ggc gac cat gaa ccg gat ttc gaa acc ccg ctg aat gag ctg ggc Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly 485 490 495	1488
25	tac gat tgc cac gac gaa acc aat aac ccg gcg ttc agg ttc ttt ttg Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu 500 505 510	1536
30	gcg ggt tag Ala Gly	1545
35	<210> 6 <211> 514 <212> PRT <213> Escherichia coli	
40	<400> 6 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr 1 5 10 15	
45	Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr 20 25 30	
50	Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile 35 40 45	
55	Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg 50 55 60	
60	Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His 65 70 75 80	
	Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe 85 90 95	
	Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala 100 105 110	
	Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Gly Glu Val 115 120 125	

Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu  
 130 135 140

5 Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro  
 145 150 155 160

Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln  
 10 165 170 175

Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Leu  
 180 185 190

15 Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys  
 195 200 205

Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu  
 210 215 220

20 Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu  
 225 230 235 240

Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln  
 25 245 250 255

Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala  
 260 265 270

30 Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Glu Pro Ser  
 275 280 285

Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn  
 290 295 300

35 Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn  
 305 310 315 320

Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln  
 40 325 330 335

Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe  
 340 345 350

45 Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn  
 355 360 365

Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg  
 370 375 380

50 Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn  
 385 390 395 400

Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys  
 55 405 410 415

Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln  
 420 425 430

60 Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu  
 435 440 445

Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His  
 450 455 460  
 Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu  
 5 465 470 475 480  
 Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly  
 485 490 495  
 10 Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu  
 500 505 510  
 Ala Gly  
 15  
 <210> 7  
 <211> 1545  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli  
 20  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1542)  
 25 <223> ilvA-Allel  
 30  
 <220>  
 <221> mutation  
 <222> (856)..(856)  
 <223>  
 35 <400> 7  
 atg gct gac tcg caa ccc ctg tcc ggt gct ccg gaa ggt gcc gaa tat 48  
 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr  
 1 5 10 15  
 40 tta aga gca gtg ctg cgc gcg ccg gtt tac gag gcg gcg cag gtt acg 96  
 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr  
 20 25 30  
 45 ccg cta caa aaa atg gaa aaa ctg tcg cgt ctt gat aac gtc att 144  
 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile  
 35 40 45  
 50 ctg gtg aag cgc gaa gat cgc cag cca gtg cac agc ttt aag ctg cgc 192  
 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg  
 55 55 60  
 50 ggc gca tac gcc atg atg gcg ggc ctg acg gaa gaa cag aaa gcg cac 240  
 Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80  
 55 ggc gtg atc act gct tct gcg ggt aac cac gcg cag ggc gtc gcg ttt 288  
 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95  
 60 tct tct gcg cgg tta ggc gtg aag gcc ctg atc gtt atg cca acc gcc 336  
 Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 100 105 110

	acc gcc gac atc aaa gtc gac gcg gtg cgc ggc ttc ggc ggc gaa gtg Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Glu Val 115 120 125	384
5	ctg ctc cac ggc gcg aac ttt gat gaa gcg aaa gcc aaa gcg atc gaa Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu 130 135 140	432
10	ctg tca cag cag cag ggg ttc acc tgg gtg ccg ccg ttc gac cat ccg Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro 145 150 155 160	480
15	atg gtg att gcc ggg caa ggc acg ctg gcg ctg gaa ctg ctc cag cag Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln 165 170 175	528
20	gac gcc cat ctc gac cgc gta ttt gtg cca gtc ggc ggc ggc ggt ctg Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Leu 180 185 190	576
	gct gct ggc gtg gcg gtg ctg atc aaa caa ctg atg ccg caa atc aaa Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys 195 200 205	624
25	gtg atc gcc gta gaa gcg gaa gac tcc gcc tgc ctg aaa gca gcg ctg Val Ile Ala Val Glu Ala Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu 210 215 220	672
30	gat gcg ggt cat ccg gtt gat ctg ccg cgc gta ggg cta ttt gct gaa Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu 225 230 235 240	720
35	ggc gta gcg gta aaa cgc atc ggt gac gaa acc ttc cgt tta tgc cag Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln 245 250 255	768
40	gag tat ctc gac gac atc atc acc gtc gat agc gat gcg atc tgt gcg Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala 260 265 270	816
	gcg atg aag gat tta ttc gaa gat gtg cgc gcg gtg gcg aaa ccc tct Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Lys Pro Ser 275 280 285	864
45	ggc gcg ctg gcg ctg gcg gga atg aaa aaa tat atc gcc ctg cac aac Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn 290 295 300	912
50	att cgc ggc gaa cgg ctg gcg cat att ctt tcc ggt gcc aac gtg aac Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn 305 310 315 320	960
55	ttc cac ggc ctg cgc tac gtc tca gaa cgc tgc gaa ctg ggc gaa cag Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln 325 330 335	1008
	cgt gaa gcg ttg ttg gcg gtg acc att ccg gaa gaa aaa ggc agc ttc Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe 340 345 350	1056
60		

	ctc aaa ttc tgc caa ctg ctt ggc ggg cgt tcg gtc acc gag ttc aac Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn 355 360 365	1104
5	tac cgt ttt gcc gat gcc aaa aac gcc tgc atc ttt gtc ggt gtg cgc Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg 370 375 380	1152
10	ctg agc cgc ggc ctc gaa gag cgc aaa gaa att ttg cag atg ctc aac Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn 385 390 395 400	1200
15	gac ggc ggc tac agc gtg gtt gat ctc tcc gac gaa atg gcg aag Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys 405 410 415	1248
20	cta cac gtg cgc tat atg gtc ggc gga cgt cca tcg cat ccg ttg cag Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln 420 425 430	1296
25	gaa cgc ctc tac agc ttc gaa ttc ccg gaa tca ccg ggc gcg ctg ctg Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Pro Ser Pro Gly Ala Leu Leu 435 440 445	1344
30	cgc ttc ctc aac acg ctg ggt acg tac tgg aac att tct ttg ttc cac Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His 450 455 460	1392
35	tat cgc agc cat ggc acc gac tac ggg cgc gta ctg gcg gcg ttc gaa Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu 465 470 475 480	1440
40	ctt ggc gac cat gaa ccg gat ttc gaa acc ccg ctg aat gag ctg ggc Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly 485 490 495	1488
45	tac gat tgc cac gac gaa acc aat aac ccg gcg ttc agg ttc ttt ttg Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu 500 505 510	1536
50	gcg ggt tag Ala Gly	1545
55	<210> 8 <211> 514 <212> PRT <213> Escherichia coli	
60	<400> 8 Met Ala Asp Ser Gln Pro Leu Ser Gly Ala Pro Glu Gly Ala Glu Tyr 1 5 10 15 Leu Arg Ala Val Leu Arg Ala Pro Val Tyr Glu Ala Ala Gln Val Thr 20 25 30 Pro Leu Gln Lys Met Glu Lys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Asn Val Ile 35 40 45 Leu Val Lys Arg Glu Asp Arg Gln Pro Val His Ser Phe Lys Leu Arg 50 55 60	

Gly Ala Tyr Ala Met Met Ala Gly Leu Thr Glu Glu Gln Lys Ala His  
 65 70 75 80

5 Gly Val Ile Thr Ala Ser Ala Gly Asn His Ala Gln Gly Val Ala Phe  
 85 90 95

Ser Ser Ala Arg Leu Gly Val Lys Ala Leu Ile Val Met Pro Thr Ala  
 10 100 105 110

Thr Ala Asp Ile Lys Val Asp Ala Val Arg Gly Phe Gly Glu Val  
 115 120 125

15 Leu Leu His Gly Ala Asn Phe Asp Glu Ala Lys Ala Lys Ala Ile Glu  
 130 135 140

Leu Ser Gln Gln Gln Gly Phe Thr Trp Val Pro Pro Phe Asp His Pro  
 145 150 155 160

20 Met Val Ile Ala Gly Gln Gly Thr Leu Ala Leu Glu Leu Leu Gln Gln  
 165 170 175

Asp Ala His Leu Asp Arg Val Phe Val Pro Val Gly Gly Gly Leu  
 25 180 185 190

Ala Ala Gly Val Ala Val Leu Ile Lys Gln Leu Met Pro Gln Ile Lys  
 195 200 205

30 Val Ile Ala Val Glu Ala Glu Asp Ser Ala Cys Leu Lys Ala Ala Leu  
 210 215 220

Asp Ala Gly His Pro Val Asp Leu Pro Arg Val Gly Leu Phe Ala Glu  
 35 225 230 235 240

Gly Val Ala Val Lys Arg Ile Gly Asp Glu Thr Phe Arg Leu Cys Gln  
 245 250 255

Glu Tyr Leu Asp Asp Ile Ile Thr Val Asp Ser Asp Ala Ile Cys Ala  
 40 260 265 270

Ala Met Lys Asp Leu Phe Glu Asp Val Arg Ala Val Ala Lys Pro Ser  
 275 280 285

45 Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Met Lys Lys Tyr Ile Ala Leu His Asn  
 290 295 300

Ile Arg Gly Glu Arg Leu Ala His Ile Leu Ser Gly Ala Asn Val Asn  
 50 305 310 315 320

Phe His Gly Leu Arg Tyr Val Ser Glu Arg Cys Glu Leu Gly Glu Gln  
 325 330 335

Arg Glu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ile Pro Glu Glu Lys Gly Ser Phe  
 55 340 345 350

Leu Lys Phe Cys Gln Leu Leu Gly Gly Arg Ser Val Thr Glu Phe Asn  
 355 360 365

60 Tyr Arg Phe Ala Asp Ala Lys Asn Ala Cys Ile Phe Val Gly Val Arg  
 370 375 380

Leu Ser Arg Gly Leu Glu Glu Arg Lys Glu Ile Leu Gln Met Leu Asn  
 385 390 395 400

5 Asp Gly Gly Tyr Ser Val Val Asp Leu Ser Asp Asp Glu Met Ala Lys  
 405 410 415

Leu His Val Arg Tyr Met Val Gly Gly Arg Pro Ser His Pro Leu Gln  
 420 425 430

10 Glu Arg Leu Tyr Ser Phe Glu Phe Pro Glu Ser Pro Gly Ala Leu Leu  
 435 440 445

Arg Phe Leu Asn Thr Leu Gly Thr Tyr Trp Asn Ile Ser Leu Phe His  
 450 455 460

15 Tyr Arg Ser His Gly Thr Asp Tyr Gly Arg Val Leu Ala Ala Phe Glu  
 465 470 475 480

20 Leu Gly Asp His Glu Pro Asp Phe Glu Thr Arg Leu Asn Glu Leu Gly  
 485 490 495

Tyr Asp Cys His Asp Glu Thr Asn Asn Pro Ala Phe Arg Phe Phe Leu  
 500 505 510

25 Ala Gly

30 <210> 9  
 <211> 1548  
 <212> DNA  
 <213> Escherichia coli

35 <220>  
 <221> DNA  
 <222> (1)...(1548)  
 <223>

40 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (527)...(952)  
 <223> yjgF-Orf

45 <400> 9  
 tcgcgatctg gtactgttaag gggaaataga gatgacacac gataataaat tgcagggttga 60  
 agctattaaa cgcggcacgg taattgacca tatccccgcc cagatcggtt ttaagctgtt  
 50 gagtctgttc aagctgaccg aaacggatca gcgcacacc accgtctga acctgccttc 120  
 tggcgagatg ggccgcaaag atctgatcaa aatcgaaaat accttttga gtgaagatca 180  
 55 agtagatcaa ctggcattgt atgcgccgca agccacgggtt aaccgtatcg acaactatga 300  
 agtggtggtt aaatcgccca caagtctgcc ggagcgcatac gacaatgtgc tggctgccc 360  
 60 gaacagcaac tgtatcagcc atgccgaacc ggttcatcc agctttgccg tgcgaaaacg 420  
 cgccaatgat atcgcgctca aatgcaaata ctgtaaaaa gagtttccc ataatgtggt 480

	gctggccaat taattgcgggt tggtaataaaa agtctggctc cctata atg agc cag Met Ser Gln 1	535
5	act ttt tac cgc tgt aat aaa gga gaa atc atg agc aaa act atc gcg Thr Phe Tyr Arg Cys Asn Lys Gly Glu Ile Met Ser Lys Thr Ile Ala 5 10 15	583
10	acg gaa aat gca ccg gca gct atc ggt cct tac gta cag ggc gtt gat Thr Glu Asn Ala Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Val Gln Gly Val Asp 20 25 30 35	631
15	ctg ggc aat atg atc atc acc tcc ggt cag atc ccg gta aat ccg aaa Leu Gly Asn Met Ile Ile Thr Ser Gly Gln Ile Pro Val Asn Pro Lys 15 40 45 50	679
20	acg ggc gaa gta ccg gca gac gtc gct gca cag gca cgt cag tcg ctg Thr Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Ala Ala Gln Ala Arg Gln Ser Leu 55 60 65	727
25	gat aac gta aaa gcg atc gtc gaa gcc gct ggc ctg aaa gtg ggc gac Asp Asn Val Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Leu Lys Val Gly Asp 70 75 80	775
30	atc gtt aaa act acc gtg ttt gta aaa gat ctg aac gac ttc gca acc Ile Val Lys Thr Val Phe Val Lys Asp Leu Asn Asp Phe Ala Thr 85 90 95	823
35	gta aac gcc act tac gaa gcc ttc ttc acc gaa cac aac gcc acc ttc Val Asn Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Phe Thr Glu His Asn Ala Thr Phe 100 105 110 115	871
40	ccg gca cgt tct tgc gtt gaa gtt gcc cgt ctg ccg aaa gac gtg aag Pro Ala Arg Ser Cys Val Glu Val Ala Arg Leu Pro Lys Asp Val Lys 120 125 130	919
45	att gag atc gaa gcg atc gct gtt cgt cgc taa tcttgatgga aatccggct Ile Glu Ile Glu Ala Ile Ala Val Arg Arg 135 140	972
50	atcatgcccg gattaagtct gatgacaaac gcaaaatcgc ctgatgcgt acgcttatca ggcctacgtg attcctgcaa ttattgaat ttgttggccg gataaggcat ttacggcga tccggcatga aaaaaactca ctttgtctac aatctgaatc gggctatcg tgcccagtt attctttatt gccagccgta acgacggcta tagaaccctt tcaccaactg gttaatgtc atataccctg ccagaatcgc aaccagccac gggaaatagc ttaacggcag cgccgtata tgcatgatca ttaacggcca cgtatgcacag ctctgaataa acggcacacg gcgggtgcgg 55 atcatatgca caatcagcgt ttgcgacagt aagcccacca caaaccatcc cgactggaac agcgtttgcg tttccggcgt gttggcatgg aataccacc acatcaggca aaacgtcaaa atatcgaaga tcgagctgat cggtccgaag aagatc	1032 1092 1152 1212 1272 1332 1392 1452 1512 1548
60		

<210> 10  
<211> 141  
<212> PRT  
5 <213> Escherichia coli

<400> 10  
Met Ser Gln Thr Phe Tyr Arg Cys Asn Lys Gly Glu Ile Met Ser Lys  
1 5 10 15

10 Thr Ile Ala Thr Glu Asn Ala Pro Ala Ala Ile Gly Pro Tyr Val Gln  
20 25 30

15 Gly Val Asp Leu Gly Asn Met Ile Ile Thr Ser Gly Gln Ile Pro Val  
35 40 45

Asn Pro Lys Thr Gly Glu Val Pro Ala Asp Val Ala Ala Gln Ala Arg  
50 55 60

20 Gln Ser Leu Asp Asn Val Lys Ala Ile Val Glu Ala Ala Gly Leu Lys  
65 70 75 80

25 Val Gly Asp Ile Val Lys Thr Thr Val Phe Val Lys Asp Leu Asn Asp  
85 90 95

Phe Ala Thr Val Asn Ala Thr Tyr Glu Ala Phe Phe Thr Glu His Asn  
100 105 110

30 Ala Thr Phe Pro Ala Arg Ser Cys Val Glu Val Ala Arg Leu Pro Lys  
115 120 125

Asp Val Lys Ile Glu Ile Glu Ala Ile Ala Val Arg Arg  
130 135 140